

**(12) OFFICIAL GAZETTE FOR LAID-OPEN  
PATENT APPLICATIONS (A)**

**(19) JAPANESE PATENT OFFICE (JP)**

**(11) Japanese Laid-Open Patent Application (Kokai) No. 5-38297**

**(43) Disclosure Date:** February 19, 1993

---

(51)Int. Cl. <sup>5</sup>	ID Code(s)	Intra-Bureau Nos.	F I	Technical Classification
C 12 Q 1/00		Z 6807-4B		
C 12 M 1/34		E 7229-4B		
1/40		B 2104-4B		
C 12 Q 1/42		6807-4B		
G 01 N 21/64		Z 9115-2J		
G 01 N 33/535		8310-2J		
33/543		C 7906-2J		

Request for Examination: Not yet submitted

Number of Claims: 9 (Total of 18 pages [in original])

---

<b>(21) Application No.:</b>	3-146301
<b>(22) Filing Date:</b>	<u>June 18, 1991</u>
<b>(71) Applicant:</b>	00000330 Tosoh Corp. 4560 Kaisei-cho, Shinnan'yo-shi, Yamaguchi
<b>(72) Inventor:</b>	Hidechika Hayashi 1-19 Tokiwadai, Hodogaya -ku, Yokohama, Kanagawa
<b>(72) Inventor:</b>	Yoshihiko Umegaya 4501 Totsuka-cho, Totsuka-ku, Yokohama, Kanagawa
<b>(72) Inventor:</b>	Yukio Mitsuhisa 2398 Kawaraguchi, Ebina-shi, Kanagawa
<b>(74) Agent:</b>	Shohei Honda, Patent Attorney (and 4 others)

---

(54) [ Title of the Invention ]    **Method and Apparatus for Assay of Enzymatic Activity**

(57) [ Abstract ]

[ Object ]    To allow the activity of an enzyme bonded to a biological substance or the like in a minute amount of sample to be measured accurately without being affected by air bubbles or the meniscus.

[ Structure ]    A reference substance is admixed into a sample, the fluorescence intensity of a substance which varies with the action of an enzyme is assayed, the fluorescence intensity of the reference substance on which the enzyme does not act is assayed, and the amount of biological substance in the sample is quantified from these two fluorescence intensities.

**[ Claims ]**

**[ Claim 1 ]** A method for assaying enzymatic activity, characterized by comprising:

directing excitation light at a sample including an enzyme, a substrate which forms a product through the action of the enzyme, and a reference substance which is not acted on by said enzyme;

determining a first measured value for fluorescence intensity at a wavelength which includes at least the fluorescent light from said product out of all the fluorescent light emitted from said sample as a result of this excitation;

determining a second measured value for fluorescence intensity at a wavelength which includes at least the fluorescent light from said reference substance and is different from the wavelength at which said first measured value was determined; and

determining the activity of said enzyme on the basis of the ratio of the first measured value to the second measured value.

**[ Claim 2 ]** A method for assaying enzymatic activity as defined in Claim 1, characterized in that the substrate and the product are both fluorescent substances.

**[ Claim 3 ]** A method for assaying enzymatic activity as defined in Claim 1 or 2, characterized in that the excitation light is set so as to include a wavelength region in which both the reference substance and at least one of the substrate or the product can be excited, the first measured value is measured in the wavelength region of the fluorescent light emitted from the substrate or the product or both, and the second measured value is measured in the wavelength region which substantially does not include the fluorescent light emitted from the substrate and the product and which almost completely comprises the fluorescent light emitted from the reference substance.

**[ Claim 4 ]** A method for assaying enzymatic activity as defined in any of Claims 1 to 3, characterized in that the enzyme activity is determined on the basis of the rate change over time in the quotient obtained by dividing the first measured value by the second measured value.

**[ Claim 5 ]** A method for assaying enzymatic activity as defined in any of Claims 1 to 4, characterized in that the enzyme is the object of measurement in enzyme labeled immunoassay.

**[ Claim 6 ]** A method for assaying enzymatic activity as defined in any of Claims 1 to 4, characterized in that the enzyme is the object of measurement in enzyme labeled DNA hybridization.

**[ Claim 7 ]** An apparatus for assaying enzymatic activity, characterized by comprising:

light projecting means for directing excitation light at a sample including a fluorescent substance which increases or decreases through the action of an enzyme, and a reference substance which emits fluorescence and is not acted on by the enzyme;

first photosensor means for measuring fluorescence intensity by extracting out of the entire fluorescence emitted by the sample that wavelength component at which a first measured value originating from said fluorescent substance is determined;

second photosensor means for measuring fluorescence intensity by extracting out of the entire fluorescence emitted by the sample that wavelength component at which a second measured value originating from said reference substance is determined; and

computing means for computing the enzymatic activity from input of the measured values measured by the first photosensor means and the second photosensor means.

[ Claim 8 ] An apparatus for assaying enzymatic activity as defined in Claim 7, characterized by the overlapping provision of an optical path for directing the excitation light from the light projecting means at an open-at-the-top vessel filled with the sample, and an optical path for the fluorescent light which is emitted from the sample inside this vessel and is incident on the photosensor means, so that light goes in and out of the open top of said vessel.

[ Claim 9 ] An apparatus for assaying enzymatic activity as defined in Claim 7 or 8, characterized in that the computing means has a division circuit for dividing the first measured value by the second measured value.

#### **[Detailed Description of the Invention]**

[ 0001 ]

#### **[Field of Industrial Utilization]**

The present invention relates to a method and an apparatus for assaying the activity of an enzyme used as an assay label for immune reactions and the like, through the detection of the fluorescence intensity of a substance having been acted upon by the enzyme.

[ 0002 ]

#### **[Background of the Invention and Prior Art]**

Conventionally known methods for assaying a minute quantity of a biological substance include enzyme labeled immunoassay and enzyme labeled DNA hybridization in which an enzyme is used as a label.

[ 0003 ] These methods are based on a principle that the presence or amount of a biological substance is determined by assaying the activity of an enzyme linked directly or indirectly to an immune complex or the like formed through an immune reaction or the like, through the detection of a change in the substrate. Known examples of such methods include measurement of the change in the light absorption coefficient of a sample that has been subjected to the action of enzymatic activity, measurement of the change in the fluorescence intensity of a sample that has been subjected to the action of enzymatic activity, and measurement of the change in light emission intensity of a sample that has been subjected to the action of enzymatic activity. Among these methods, the last two methods involving the assay of enzyme activity by utilizing fluorescence or light

emission are advantageous in that a higher sensitivity is achievable in a shorter time than with the method which utilizes light absorption for enzymatic activity assay. The fluorescence method is known to be highly sensitive for assaying enzymatic activity.

[ 0004 ] Several methods have been proposed for quantitative determination of biological substances and the like on the basis of change in the fluorescence intensity of a sample. Examples are a method in which the measurement is conducted at a specific point in time after the initiation of an enzymatic reaction and the enzymatic activity is derived from the measured value (called a one-point method); a method in which the measurement is conducted at two points in time during the progress of a series of enzymatic reactions and the enzymatic activity is derived from the difference in the measured values (called a two-point method); and a method in which the measurement is conducted more or less continuously as the enzymatic reaction proceeds and the enzymatic activity is derived from the rate change in the continuously measured values (called a rate method).

[ 0005 ] In recent years the relevance and evaluation of quantitative determination of a minute quantity of a substance have been steadily given more attention, particularly in fields such as clinical diagnosis. Consequently, high precision and high sensitivity have been increasingly required in the determination of a minute quantity of a biological sample. To meet this requirement, proposals have been made regarding a system which is free from contamination among a plurality of samples, a detector suitable for continuous measurement of a plurality of specimens at a high detection sensitivity, and so forth.

[ 0006 ]

#### **[Problems Which the Invention is Intended to Solve]**

It has been indicated that conventional methods and apparatus which have been proposed or put into practice for the quantitative determination of biological substances and the like with high sensitivity and high precision are limited in terms of raising measurement accuracy over a certain level because the effect of air bubbles present in the sample, the meniscus of the sample liquid, and or forth cannot be ignored. One reason the effect of these factors imposes limitations is that samples of biological substances and the like to be measured are only available in a minute amount in most cases. It is often the case that the above-mentioned effects cannot be ignored for the very reason that the amount is so small.

[ 0007 ] For example, the presence of bubbles in the sample liquid gives a larger measurement value for fluorescence than when no bubbles are present, so disappearance of the bubbles during the measurement will give a lower value in a rate method, for example, than the actual value. On the other hand, when a substrate which is to undergo reaction with a label enzyme is injected into a reaction vessel, the substrate dispensing should be conducted as quickly as possible in order to treat quickly a large number of samples, and furthermore, any adhesion of liquid drops to the tip of the nozzle needs to be avoided at the completion of dispensing of the sample liquid in order to obtain higher accuracy of the aliquots. However, the dispensed liquid is more prone to foaming if the

liquid discharge rate is raised to satisfy the above requirements. In enzyme labeled immunoassay, an immune reaction complex and a non-reactant are generally separated from each other (B/F separation) before the substrate is dispensed, but more bubbles tend to be formed if the concentration of the surfactant usually contained in the washing solution is raised.

[ 0008 ] In view of this, a new approach is needed that will overcome these problems in principle and make more accurate measurement possible.

[ 0009 ] Apart from the above problems, there is a need for higher sensitivity in fluorescence measurement. For example, in immunoassay of TSH (thyroid-stimulating hormone), the lower detection limit has conventionally been at a level of about 0.1  $\mu$ IU/ml, but more recently a lower detection limit of 0.01  $\mu$ IU/ml has come to be required for the diagnosis of disease states in which an abnormally low TSH value is exhibited. Therefore, a higher detection sensitivity is needed along with a reduction in the nonspecific reaction of the labeled enzyme. For detection sensitivity to be improved, actual changes in the measured value have to be distinguished from variation caused by external disturbance or the like.

[ 0010 ] The inventors arrived at the present invention as a result of conducting research from this standpoint. An object of the present invention is to provide a method and apparatus for measurement in enzyme labeled immunoassay and enzyme labeled DNA hybridization, which are less affected by obstacles to improved measurement accuracy, such as the effect of the presence of bubbles in the sample, the effect of the meniscus, the effect that accompanies the filling of the reaction vessel with magnetic particles and moving these with a vibrating magnetic field for the purpose of sample agitation, changes over time in the light source, and so forth, and with which highly accurate and highly sensitive assaying can be performed with less error.

[ 0011 ] Another object of the present invention is to provide a method and apparatus with which the relative position of the reaction vessel to the light source is always stable and does not affect the measurement results even if there is a certain amount of variation in the quantity of light projected at the vessel, thus affording highly accurate measurement.

[ 0012 ] Yet another object of the present invention is to provide a novel method and apparatus which, when the measurement is conducted by enzyme labeled immunoassay or enzyme labeled DNA hybridization, are advantageous in terms of the automation and the structural simplification of the substrate dispensing means, the sample agitation means, and other such components that in the past imposed a large burden on the apparatus structure for the purpose of reducing measurement errors, and with which high-accuracy measurement can be sustained.

[ 0013 ]

**[Means Used to Solve the Above-Mentioned Problems and Operation of the Invention]**

In order to achieve the stated object, the inventors perfected the enzymatic activity assay method of the present invention, characterized by comprising the steps of directing excitation light at a sample including an enzyme, a substrate which forms a product through the action of the enzyme, and a reference substance which is not acted on by the above-mentioned enzyme, determining a first measured value for fluorescence intensity at a wavelength which includes at least the fluorescent light from the above-mentioned product out of all the fluorescent light emitted from the above-mentioned sample as a result of this excitation, determining a second measured value for fluorescence intensity at a wavelength which includes at least the fluorescent light from the above-mentioned reference substance and is different from the wavelength at which the above-mentioned first measured value was determined, and determining the activity of the above-mentioned enzyme on the basis of the ratio of the first measured value to the second measured value.

[ 0014 ] The enzymatic activity can be assayed on the basis of the rate change over time in the quotient obtained by dividing a first measured value in a first wavelength region by the above-mentioned second measured value, using a calibration curve prepared in advance by the use of a known sample, for example. A method in which the rate change in the fluorescence intensity over time is determined by the above-mentioned two-point method, or a method in which the measurement is conducted more or less continuously as the enzymatic reaction proceeds and the enzymatic activity is derived from the rate change in the continuously measured values (a rate method), is recommended as a particularly favorable method, but other methods are also possible.

[ 0015 ] The features of the method of the present invention will now be described. It is assumed here that the above-mentioned substrate, the product formed through enzymatic action, and the reference substance are all fluorescent substances. If we consider the fluorescent light emitted from the various substances when excitation light is directed at these substances, we find that the intensity of the fluorescence is proportional to the concentration of each fluorescent substance, and external disturbance such as bubbles affects all of the measured data. Therefore, the first measured value (FI 1) obtained at the above specified wavelength and the second measured value (FI 2) obtained at a different wavelength are respectively expressed by the equations below.

[ 0016 ]

$$(FI\ 1) = p \times (k_1 \times [\text{substrate}] + k_2 \times [\text{product}] + k_3 \times [\text{reference substance}])$$

$$(FI\ 2) = p \times (k_4 \times [\text{substrate}] + k_5 \times [\text{product}] + k_6 \times [\text{reference substance}])$$

(Where  $p$  is a coefficient of the fluorescence variation affecting the entire sample and resulting from bubbles and the like; the terms in brackets are the concentrations of the respective substances; and  $k_1$  to  $k_6$  are respectively the proportion coefficients corresponding to the respective wavelengths of the various substances, where  $k_1/k_4 = k_2/k_5 = k_3/k_6 \neq 0$ .)

Therefore, the ratio of (FI 1) to (FI 2) in the present invention is shown by Formula (1) below. This formula is transformed to Formula (2) to represent the substrate concentration as a function of the product concentration. Thus the concentration of the product can be obtained from the reference substance concentration and the proportion coefficients k1 to k6 according to Formula (2).

[ 0017 ]

**[ Mathematical Formula 1 ]**

$$FI\ 1 = k1 \times [substrate] + k2 \times [product] + k3 \times [reference\ substance] \quad \dots(1)$$

$$FI\ 2 = k4 \times [substrate] + k5 \times [product] + k6 \times [reference\ substance]$$

$$\begin{aligned} & (k1 \times ([substrate]_0 - [product]) + k2 \times [product] + k3 \times [reference\ substance]) \times FI\ 2 = \\ & (k4 \times ([substrate]_0 - [product]) + k5 \times [product] + k6 \times [reference\ substance]) \times FI\ 1 \\ & \dots (2) \end{aligned}$$

(Where [substrate]<sub>0</sub> is the known initial concentration of the substrate added to the reaction vessel.)

[ 0018 ] Determining the ratio of the two measured values using Formula (1) or (2) reveals that the effect of fluorescent light variation is removed from the value indicating enzymatic activity.

[ 0019 ] The above formulas describe in general terms a case in which the substrate, the product, and the reference substance all emit fluorescence when irradiated with excitation light, but other cases, where k1=0 or k1=k4=k5=0, are also possible by selecting the wavelength for obtaining the first measured value, selecting the wavelength for obtaining the second measured value, and so on (in addition to a case where the coefficient or coefficients are completely zero, a case in which they are can be substantially considered as being zero is also possible). The object of the method of the present invention can be achieved by making it essential that the fluorescence intensity of the product be found from one measured value (eg, the first measured value), and that the fluorescence intensity of the reference substance be found from the other measured value (eg, the second measured value).

[ 0020 ] The wavelength of the excitation light in the method of the present invention is selected so as to include a wavelength region in which excite at least one of the substrate and the product as well as the reference substance can be excited.

[ 0021 ] The fluorescence wavelength that is measured in order to determine the first measured value out of all the fluorescent light emitted from the sample (hereinafter referred to as the "first fluorescence wavelength") is selected from a range including the wavelength region of the fluorescent light emitted from the substrate or the product, and the fluorescence wavelength that is measured in order to determine the second measured value (hereinafter referred to as the "second fluorescence wavelength") is selected from a



range including the wavelength region of the fluorescent light emitted from the reference substance. The term "wavelength" here encompasses the specified wavelength region.

[ 0022 ]        The wavelength of the excitation light and the first fluorescence wavelength are selected such that the change in the fluorescence characteristics caused by the change of the substrate into the product is reflected by the measured fluorescence intensity.

[ 0023 ]        The enzyme may be a free enzyme of natural origin, or may be an enzyme linked to a free antigen, antibody, or DNA, or may be an enzyme bonded indirectly to the inner wall of a small container or the surface of a sheet as a result of enzyme labeled immunoassay or enzyme labeled DNA hybridization.

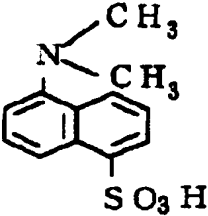
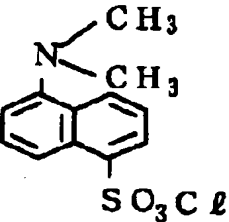
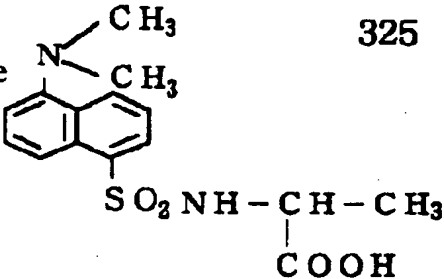
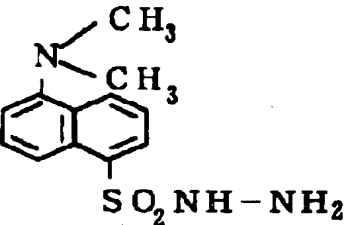
[ 0024 ]        Examples of labeled enzymes for use in enzyme labeled immunoassay and enzyme labeled DNA hybridization include alkaline phosphatase,  $\beta$ -galactosidase, and the like. An example of a substrate which changes its fluorescence intensity by the action of an alkaline phosphatase is 4-methylumbelliferyl phosphate. This substrate is converted to 4-methylumbelliferone by the action of the above enzyme. An example of a substrate which changes its fluorescence intensity by the action of  $\beta$ -galactosidase is 4-methylumbelliferyl galactoside. This substrate is converted to 4-methylumbelliferone by the action of the above enzyme. If, for example, the above-mentioned product (4-methylumbelliferone) is irradiated with excitation light having a wavelength of 365 nm (see Figure 4b) under alkaline conditions (pH 10), the 4-methylumbelliferone emits fluorescence having maximum intensity at about 450 nm (see Figure 4a), while the fluorescence emitted by 4-methylumbelliferyl phosphate or 4-methylumbelliferyl galactoside is negligible. Accordingly, the intensity of fluorescence emitted by the product can be measured by irradiating a sample with excitation light of 365 nm, and extracting the fluorescence at a wavelength around 450 nm from the entire fluorescence emitted by the sample.

[ 0025 ]        The reference substance, which is added as a characteristic structural component of the present invention to a sample including the substrate and the product as mentioned above, is selected from among substances which emit fluorescent light in a fluorescence spectrum pattern that is different from the pattern of change in the fluorescence spectrum which is changed by enzymatic action after irradiation with excitation light.

[ 0026 ]        In the case of the 4-methylumbelliferone given above as a typical example, the reference substance should be selected from among substances which emit fluorescence with a wavelength of 500 nm or more, for example, on being irradiated with excitation light of 365 nm. Examples of such substance that can be used as this reference substances are shown below by Chemical Formulas 1 and 2.

[ 0027 ]

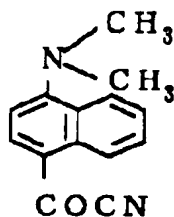
[ Chemical Formula 1 ]

	(Structural formula)	( $E_{x}^{max}$ ) nm	( $E_{m}^{max}$ ) nm
1) Dansyl compounds: (such as) Dansylsulfonic acid			
		325	550
Dansyl chloride		325	550
Dansylamino acid (such as) Dansyl-L-alanine		325	550
Dansylhydrazine		340	525

[ 0028 ]

[ Chemical Formula 2 ]

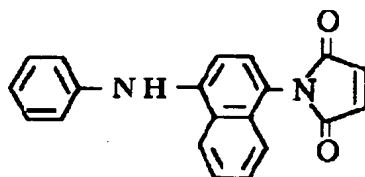
(Structural formula)	( $E_{x}^{max}$ ) nm	( $E_{em}^{max}$ ) nm
2) 4-Dimethylamino-1-naphthoynitrile		



350

530

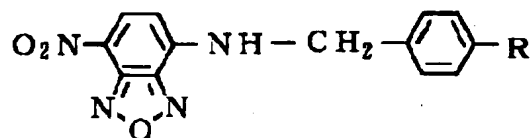
3) N-(1-anilidonaphthyl)-4-maleimide



350

530

4) 7-Benzylamino-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (R = H)  
7-(p-Methoxybenzylamino)-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (R = OCH3)



340

530

OR 458

[ 0029 ] The above substances do not have their excitation spectrum maximums at 365 nm, but the dansyl-L-alanine given above as an example has some width to its excitation spectrum as shown in Figure 5a, so irradiation with excitation light of 365 nm causes the emission of fluorescence having a maximum at about 550 nm (see Figure 5b).

[ 0030 ] In a case where 4-methylumbelliferone is used as the product of the enzymatic reaction and dansyl-L-alanine is used as the reference substance, the fluorescence spectra of the both substances partly overlap with each other (see Figures 4b and 5b). Consequently, if light with a wavelength of about 450 nm is extracted as the first fluorescence wavelength, the light will also include a slight portion of the fluorescence from the reference substance. However, this does not affect the rate change over time of the ratio of the first measured value obtained at the first fluorescence wavelength to the second measured value obtained at the above-mentioned wavelength of 500 nm or more, which is the characteristic of the present invention.

[ 0031 ] In the above case, the second measured value obtained at the second fluorescence wavelength includes a portion of the fluorescence of 4-methylumbelliferone, but the effect of the present invention can be suitably realized by selecting the second fluorescence wavelength and the concentration of the reference substance such that the influence of the 4-methylumbelliferone is not large. As a specific example, in the implementation of the above example, the concentration of the reference substance to be incorporated in the sample is preferably selected from within a range that will give sufficient fluorescence intensity at the second fluorescence wavelength and will not cause excessively large absorption of the excitation light by the reference substance. The absorption ratio generally should not be more than 50%. In a case where the fluorescence spectrum of the substrate or the product overlaps with the excitation spectrum of the reference substance, the fluorescence emitted by the substrate or the product is re-absorbed by the reference substance, so the concentration of the reference substance is preferably selected from within a range such that the proportional re-absorption is not excessively large. In general, the proportional re-absorption should not be more than 50%.

[ 0032 ] There are no particular restrictions on the sample which serves as the object of assay in the method of the present invention as long as it can be used in enzyme labeled immunoassay or enzyme labeled DNA hybridization. In most cases, the sample is put into a small container in the shape of a cup before being supplied to the assay apparatus.

[ 0033 ] The enzymatic activity assay apparatus of the present invention is characterized by a structure comprising light projecting means for directing excitation light at a sample including a fluorescent substance which increases or decreases through the action of an enzyme, and a reference substance which emits fluorescence and is not acted on by the enzyme, first photosensor means for measuring fluorescence intensity by extracting out of the entire fluorescence emitted by the sample that wavelength component at which a first measured value originating from the above-mentioned fluorescent substance is determined, second photosensor means for measuring fluorescence intensity by extracting out of the entire fluorescence emitted by the sample that wavelength component at which a second measured value originating from the above-mentioned reference substance is determined, and computing means for computing the enzymatic activity from input of the measured values measured by the first photosensor means and the second photosensor means.

[ 0034 ]        The above-mentioned light projecting means for directing excitation light is generally an optical system consisting of a suitable combination of a light source, a lens, a filter, a mirror, a condenser lens, and so on. The light source is preferably a flasher type. The reason for this is that it permits the influence of external disturbing light and the like to be eliminated from the signal obtained from the photosensor by synchronous wave detection at the light-receiving side, so that just the fluorescence component originating in the sample is extracted, which results in more reliable measurement of fluorescence intensity. A mechanical chopper may be used as the flashing light source, but a discharge lamp or a fluorescent lamp which flashes at a frequency ranging from several dozen hertz to several hundred hertz is advantageous in terms of the durability over the course of extended continuous operation. The power supply may be an AC or pulse power supply with the above-mentioned frequency, or a high frequency AC power supply of several kilohertz to several dozen kilohertz which is switched on and off at the above frequency.

[ 0035 ]        The photosensor means of the enzymatic activity assay apparatus of the present invention consists of first and second photosensor means, with each of the photosensor means consisting of a combination of a light-receiving optical system including a mirror, a condenser lens, a filter, a photosensor such as a photodiode or a photomultiplier, and so on, and electrical circuit elements such as an amplifier. If a light source flashing means is employed as described above, a wave detector which synchronously detects electrical signals from a photosensor by utilizing clock signals for flashing the light source (such as a fluorescence lamp) can also be used along with the other components.

[ 0036 ]        The enzymatic activity assay apparatus of the present invention may be of a configuration in which the fluorescent light emitted from the sample is detected in a direction opposite to the projection of the excitation light to the sample, or may be of a configuration in which the direction of the fluorescence detection is perpendicular to the projection of the excitation light. For efficient continuous assay of enzymatic activity of a large number of samples, however, it is preferable to employ a top-top configuration in which the optical path of the light receiving system is superposed over the optical path of the light-projection system. In an example, a dichroic mirror or the like is placed in the optical path of the light projecting system to reflect the light from the light source downward, and the fluorescence emitted upward from the sample is divided into a component of the first fluorescence wavelength and a component of the second fluorescence wavelength by a filter, a half-mirror, a dichroic mirror, or the like placed in the optical path of the light receiving system, so that the respective light components are each detected by a separate photosensor. The use of a dichroic mirror is particularly advantageous in that excitation light and fluorescence can be utilized more effectively with reduced loss by selecting the characteristics of the dichroic mirror so as to match the wavelengths of the excitation light and the fluorescence.

[ 0037 ]        The light source, the photosensor, the filter, and so on are placed in suitable positions in accordance with the characteristics of the dichroic mirror or the like being employed.

[ 0038 ] Figures 6a to 6c are schematics of the structure of the optical system of the top-top configuration mentioned above. The light from a light source 501 is directed through a half-mirror 507 or a dichroic mirror 508 at a sample 1 in a sample container 2. Fluorescence emitted by the sample is introduced through filters 505 and 506 to photosensors 503 and 504. In Figures 6b and 6c, the symbol numbers correspond respectively to the ones in Figure 6a except that the numeral 10 or 20 is added thereto, respectively.

[ 0039 ] In the division processing done by the computing device in the present invention, an electrical signal obtained with a first light receiving system and an electrical signal obtained with a second light receiving system may be processed in an analog manner, or the above electrical signals may first be converted by an A/D converter into digital signals and then processed by a digital computing circuit such as a digital computer.

[ 0040 ] Figure 7 is a schematic of a signal processing system of an assay apparatus structured as above. Figure 7a illustrates an example employing a light source 70 continuously lighted by a DC power supply 80. Figure 7(b) illustrates another example employing a light source 70 flashed by a pulse power supply 81. The light introduced to photosensors 63 and 64 is amplified as electrical signals 71 and 72 by amplifiers 73 and 74, converted to digital signals by A/D converters 75 and 76, and then processed by a digital computing circuit 77 such as a computer to calculate, for example, the change rate as a function of time and to perform division.

[ 0041 ] In Figure 7b, 82 is a clock-generating circuit that is used to synchronize the pulse power supply 81 with the synchronous wave detecting circuits 83 and 84 of the light receiving system.

[ 0042 ] Naturally, the electrical signals 71 and 72 may be inputted to an analog division circuit, the output thereof being converted into digital signals by an A/D converter and processed by a digital computing circuit such as a computer to calculate the above change rate as a function of time.

[ 0043 ]

### **[Working Examples]**

The present invention will now be described in further detail through reference to the working examples shown in the figures.

[ 0044 ]

#### **Working Example 1**

Figure 3 illustrates an example of the apparatus used for assay in the method of the present invention (whose structure comprises a top-top type of optical system). In the figure, 2 is a cup-shaped sample container (top end diameter: 10 mm, volume: 1 mL) that holds a small amount (a few microliters) of a sample liquid 1, and moves to the assay position for fluorescent light detection after going through substrate packing and enzyme reaction (not depicted). Figure 3 illustrates a state in which the sample container 1 has

been moved to the assay position. The product formed from the substrate in this example was a product from 4-methylumbelliferyl phosphate by the action of alkaline phosphatase, the product being 4-methylumbelliferone having the fluorescence characteristics shown in Figures 4a and 4b, and the reference substance was dansyl-L-alanine having the fluorescence characteristics shown in Figures 5a and 5b.

[ 0045 ] 61 is a light source that emits excitation light in the light projecting optical system. The light from the light source passes through a filter 62 that transmits light with a wavelength of 320 to 380 nm, and then the light is reflected by a half-mirror 67 to be directed downward as excitation light at the sample 1 in the sample container 2.

[ 0046 ] Fluorescence caused by irradiation with the excitation light and emitted by the sample liquid 1 passes upward through the half-mirror 67 and is separated by the dichroic mirror 68 into light including the first fluorescence wavelength and light including the second fluorescence wavelength. This dichroic mirror 68 is designed to have a property such that it transmits light having wavelength of 530 nm or longer but reflects light having wavelength of 420 to 530 nm.

[ 0047 ] The light of the first fluorescence wavelength separated by the above-mentioned dichroic mirror 68 is passed through a filter 65 which transmits light of 450 to 510 nm, and the selected wavelength of light is received by a photosensor 63. Meanwhile, the light of the second fluorescence wavelength proceeds upward and is passed through a filter 66 which transmits light of 600 nm or longer, and the selected wavelength of light is received by a photosensor 64.

[ 0048 ] The measuring apparatus structured as above was used to measure the fluorescence of a sample liquid which contained a biological substance labeled with alkaline phosphatase, 4-methylumbelliferyl phosphate as the substrate, and dansyl-L-alanine as the reference substance. The alkaline phosphatase was used in an appropriate quantity, the 4-methylumbelliferyl phosphate was at a concentration of 1 mM, and dansyl-L-alanine was at a concentration of 100  $\mu$ g/mL.

[ 0049 ] The time dependence of the measured value A of the first fluorescence wavelength and that of the measured value B of the second fluorescence wavelength detected as above are shown in Figure 1. Figure 2 shows the time dependence of the quotient obtained by dividing the first measured value at the first fluorescence wavelength by the second measured value at the second fluorescence wavelength (relative fluorescence intensity). The positions indicated by (1) to (4) in Figures 1 and 2 indicate the positions where there was a change in the intensity of the measured fluorescence as a result of the rupture or movement of bubbles formed when air was blown artificially into the sample liquid.

[ 0050 ] As can be seen from a comparison of the figures, the fluorescence intensity changes greatly when air is blown in, but the quotient of dividing the first measured fluorescence by the second measured fluorescence, shown in Figure 2, is not affected by the air bubbles. Thus it was confirmed that the method of the present invention allows accurate detection of a change in the intensity of fluorescence emitted

by a fluorescent substance, without the results being affected should any air bubbles be present in the sample.

[ 0051 ]

### Working Example 2

The following test was conducted in order to compare the results of the measurement obtained by the method of the present invention with those of a conventional method.

[ 0052 ] The following test was conducted using an apparatus AIA-1200 (made by Tosoh Corporation) having the same structure as the one employed in Working Example 1. Specifically, 50  $\mu$ L of alkaline phosphatase was dispensed manually from a pipetter into a sample container containing several magnetic particles (about 1.5 mm in diameter) for stirring, and 200  $\mu$ L of solution prepared in advance by adding 0.1 mg/mL dansyl-L-alanine (5 mg per 100 mL of the substrate solution) to a 4-methylumbelliferyl phosphate solution (prepared by dissolving 26 mg of 4-methylumbelliferyl phosphate in a 100 mL aqueous solution of 4.5 g of 2-amino-2-methyl-1-propanol) was dispensed manually from a pipetter into the container. This container was immediately moved under the detector, and the fluorescence intensity was measured every 2 seconds, beginning several seconds after the addition of the solution and continuing for 100 seconds at the first and the second wavelengths. The rate was determined according to the following calculation formula (3) by a least square method (Test Nos. 1 to 10). The results are shown in Table 1. Throughout the measurement, the magnetic particles were moved back and forth by an oscillating magnetic field. Of the tests conducted, in Nos. 1 and 9, air was blown into the liquid in the container just before the detection operation.

[ 0053 ]

$$(\text{Sig}(4\text{MU}) - \text{Sig}(4\text{MU}_0)) / (\text{ref}(\text{DLA}) - \text{ref}(\text{DLA}_0)) \quad \dots (3)$$

(Where Sig(4MU) is the measured value of fluorescence intensity at the first wavelength (substantially the fluorescence intensity of 4-methylumbelliferone); Sig(4MU<sub>0</sub>) is the measured value for the empty cup; ref(DLA) is a measured value of fluorescence intensity at the second wavelength (substantially the fluorescence intensity of the reference substance); and ref(DLA<sub>0</sub>) is the measured value for the empty cup.)

Tests were also conducted in the same manner as above except that the alkaline phosphatase was not added, and the fluorescence intensity was measured and the rate was calculated (Test Nos. 11 to 19). The results are shown in Table 2. Of the tests conducted, in Nos. 13 and 15, air was blown into the liquid in the container just before the detection operation. Agitation magnetic beads had been obtained from a commercial immunodiagnostic reagent (E Test "Tosoh" made by Tosoh Corporation) were used in this experiment. Although the beads were washed thoroughly before being used, a tiny amount of alkaline phosphatase was considered to remain nonspecifically bonded to the surface thereof.

[ 0054 ] For comparison, for the respective cases where the alkaline phosphatase was and was not added, the rates were calculated from the measured fluorescence



intensity only at the first wavelength according to a conventional method by use of the following Formula (4) by the least square method (Nos. 1 to 10 and Nos. 11 to 19). These results are given in Tables 1 and 2.

[ 0055 ]

$$((\text{Sig}(4\text{MU}) - \text{Sig}(4\text{MU}_0)) / \text{ref}(\text{UV})) \times 50 \quad \dots (4)$$

(Where  $\text{Sig}(4\text{MU})$  and  $\text{Sig}(4\text{MU}_0)$  are defined the same as in Formula (3) above. The term " $/ \text{ref}(\text{UV})$ " is for canceling the variation in the source light over time by dividing the measured value by the light intensity, and the term " $\times 50$ " is a coefficient used for convenience to facilitate the comparison of the data with the measured value of the present invention.

[ 0056 ]

**Table 1**

No	Rold (/sec)	Rnew (/sec)
1	0.232	0.256
2	0.267	0.257
3	0.276	0.259
4	0.277	0.256
5	0.280	0.256
6	0.270	0.248
7	0.236	0.224
8	0.291	0.250
9	0.267	0.253
10	0.285	0.252
Average	0.268	0.251
CV	6.9 %	3.8 %

In the table, Rold is the measured value obtained by a conventional method, Rnew is the measured value obtained by the method of the present invention, and CV is the coefficient of variation.

[ 0057 ]

Table 2

No	Rold (/sec)	Rnew (/sec)
11	$0.120 \times 10^{-3}$	$0.157 \times 10^{-3}$
12	$0.098 \times 10^{-3}$	$0.082 \times 10^{-3}$
13	$0.733 \times 10^{-3}$	$0.315 \times 10^{-3}$
14	$0.099 \times 10^{-3}$	$0.129 \times 10^{-3}$
15	$-1.05 \times 10^{-3}$	$0.023 \times 10^{-3}$
16	$-0.112 \times 10^{-3}$	$0.119 \times 10^{-3}$
17	$0.131 \times 10^{-3}$	$0.134 \times 10^{-3}$
18	$0.175 \times 10^{-3}$	$0.026 \times 10^{-3}$
19	$-0.289 \times 10^{-3}$	$0.038 \times 10^{-3}$
Average	$-0.0105 \times 10^{-3}$	$0.144 \times 10^{-3}$
SD	$0.0449 \times 10^{-3}$	$0.0998 \times 10^{-3}$

In the table, Rold is the measured value obtained by a conventional method, Rnew is the measured value obtained by the method of the present invention, and SD is the standard deviation.

[ 0058 ] The results in Table 1 confirm that the method of the present invention gives measurement results with a smaller coefficient of variation (CV value) and higher accuracy than the conventional method. The results in Table 2 confirm that the method of the present invention gives a much smaller standard deviation (SD value) than the conventional method.

[ 0059 ] To clarify the variation in the measured values when air is blown in just before the measurement, Figures 8A and 8B show the calculation results of the present invention when the above-mentioned alkaline phosphatase was added, and Figures 8a and 8b show the calculation results of the conventional method, while Figures 8C and 8D show the calculation results of the present invention when the alkaline phosphatase was not added, and Figures 8c and 8d show the calculation results of the conventional method.

[ 0060 ] It can be seen from these figures that the calculation results at the point when air was blown in were greatly disturbed in the conventional method (a to d), but that the calculation results were not affected by such disturbance with the method of the present invention (A to D).

Figures 6a to 6c each illustrate the simplified structure of an optical measurement system constituting an enzyme labeled immunoassay apparatus of the present invention;

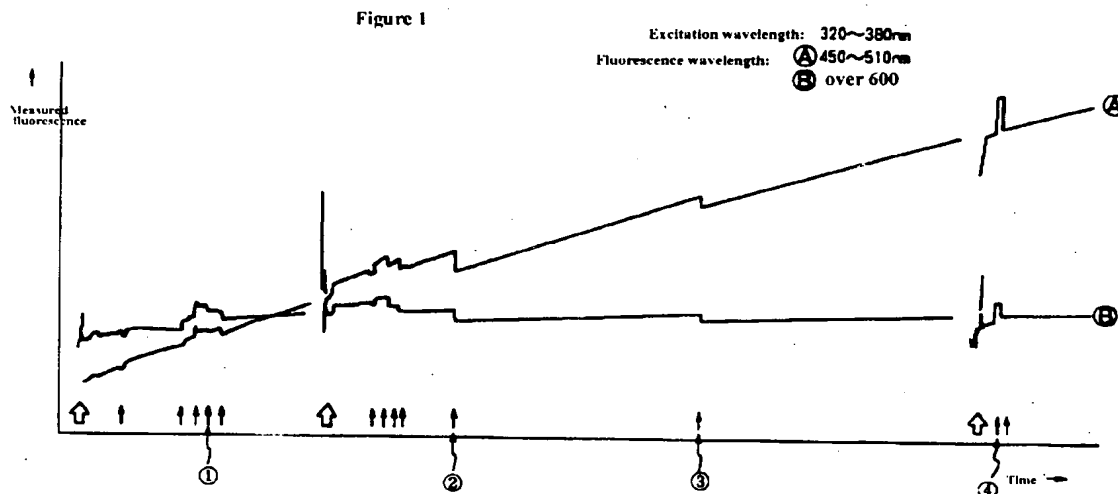
Figures 7a and 7b each illustrate signal processing in the assay method of the present invention;

Figures 8a and 8b show the change in fluorescence intensity of a liquid sample when alkaline phosphatase is added thereto, as calculated according to a conventional method, and Figures 8A and 8B show the same change in fluorescence intensity, but calculated according to the method of the present invention; and

Figures 9c and 9d show the change in fluorescence intensity of a liquid sample when alkaline phosphatase is not added thereto, as calculated according to a conventional method, and Figures 9C and 9D show the same change in fluorescence intensity, but calculated according to the method of the present invention.

#### [Explanation of the Symbols]

- 61 light source
- 62, 65, and 66 filters
- 63 and 64 photosensors
- 67 half-mirror
- 68 dichroic mirror



[ 0061 ]

### **[Effects of the Invention]**

As described above, the method and apparatus of the present invention for assaying enzymatic activity are advantageous in that highly precise measurement is made possible with extremely little error caused by bubbles in the sample and meniscus of the sample in those cases where highly accurate assay of enzymatic activity is required, such as in enzyme labeled immunoassay and enzyme labeled DNA hybridization, etc.

[ 0062 ] Another benefit is that the substrate dispensing means, the agitation means for enzymatic reaction, and other such components that in the past imposed a large burden on the apparatus structure in order to reduce measurement errors in automated measurement for enzyme labeled immunoassay and enzyme labeled DNA hybridization can be constructed more simply, while high measurement accuracy is retained.

[ 0063 ] With a conventional measuring apparatus of this type, due to the problem of deterioration over time of the emission intensity of the lamp emitting the excitation light, for example, the measured fluorescence values were corrected by a sensor which detected the emitted light intensity of this lamp (for example, a correction in which the measured fluorescence value is divided by emitted light intensity). Although the deterioration over time of the intensity of the light emitted by the lamp can be corrected with such a system, variation in the light flux coming into the sample container cannot be eliminated because of misalignment of the sample container, which is the object of measurement, and the lamp. With the method of the present invention, on the other hand, the measurement value is derived as the ratio of two fluorescence intensities at a single point in time, so the intensity of the light source does not directly affect the measurement results, and measurement accuracy is greatly improved.

[ 0064 ] As described above, the influence of external disturbance is eliminated with the present invention, which means that measurements can be made at a high degree of sensitivity.

### **[Brief Description of the Drawings]**

Figure 1 is a graph of the time dependence of the first measured value at the first fluorescence wavelength region and the second measured value at the second fluorescence wavelength region as measured in Working Example;

Figure 2 is a graph of the time dependence of the relative fluorescence intensity obtained by dividing the first measured value by the second measured value;

Figure 3 illustrates a simplified example structure of the fluorescence detector in the working examples of the present invention;

Figure 4 shows the excitation spectrum and the fluorescence spectrum of 4-methylumbelliferone, which is produced from 4-methylumbelliferyl phosphate by the action of alkaline phosphatase;

Figure 5 shows the excitation spectrum and the fluorescence spectrum of dansylalanine, which is the reference substance;

Figure 3

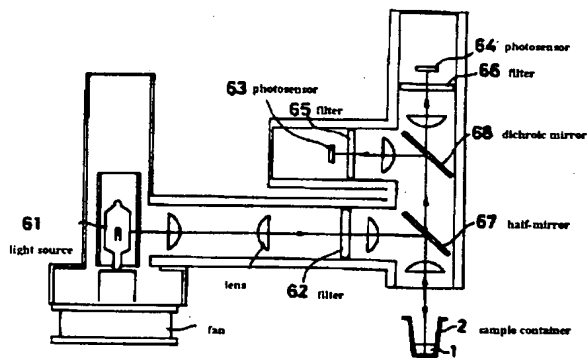


Figure 4

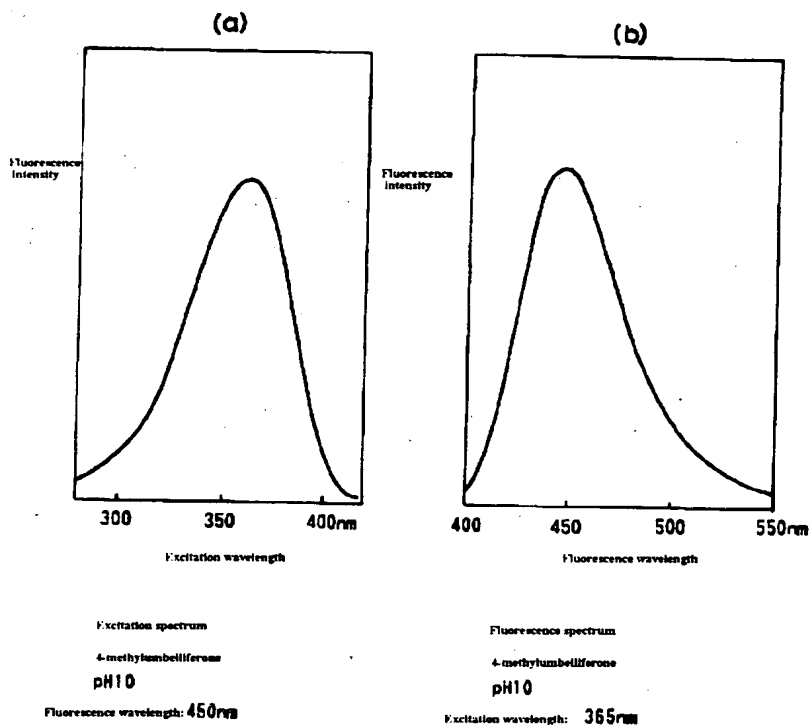


Figure 2

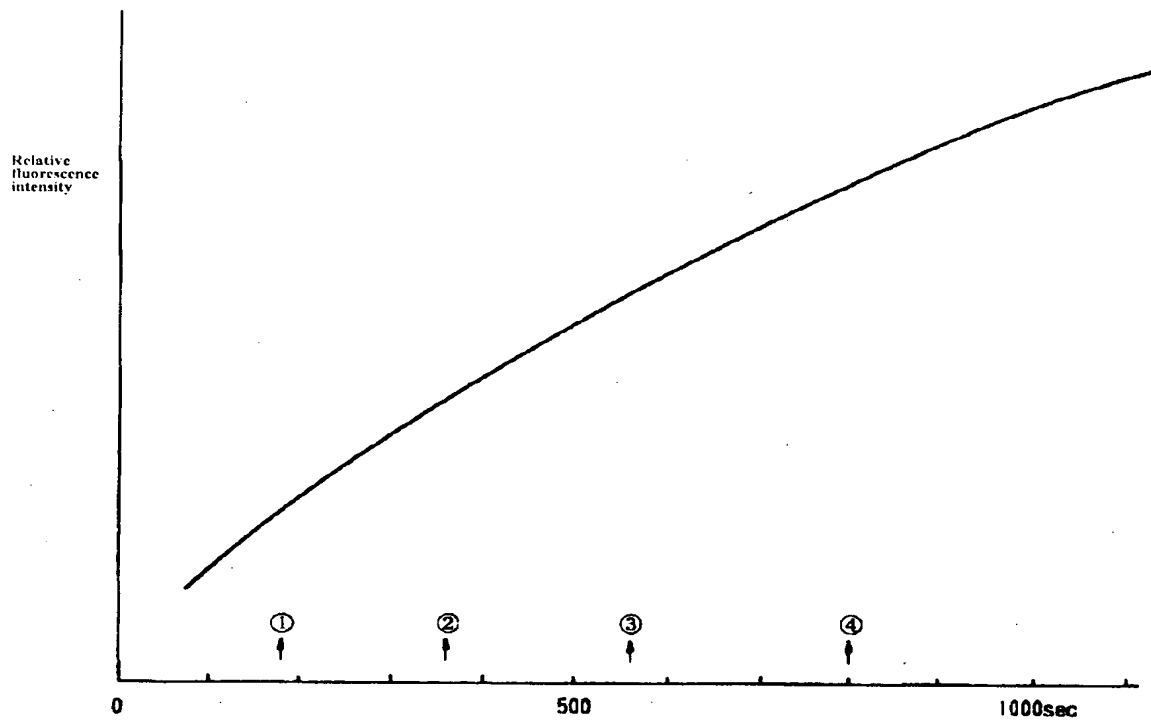
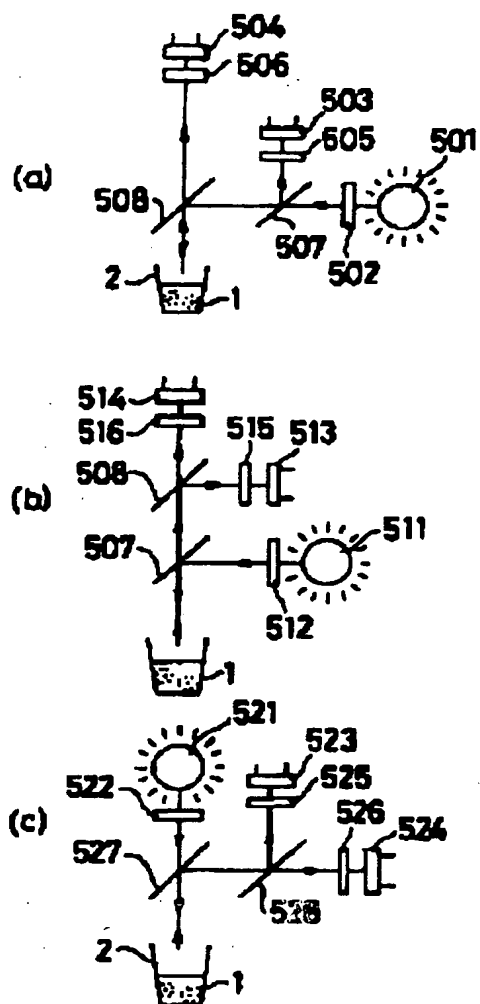


Figure 6



501, 511, 521... light sources

502, 505, 506, 512, 515, 516, 522, 525, 528... filters

503, 504, 513, 514, 523, 524... photosensors

507, 508, 517, 518, 527, 528... half-mirror or dichroic mirror

Figure 5

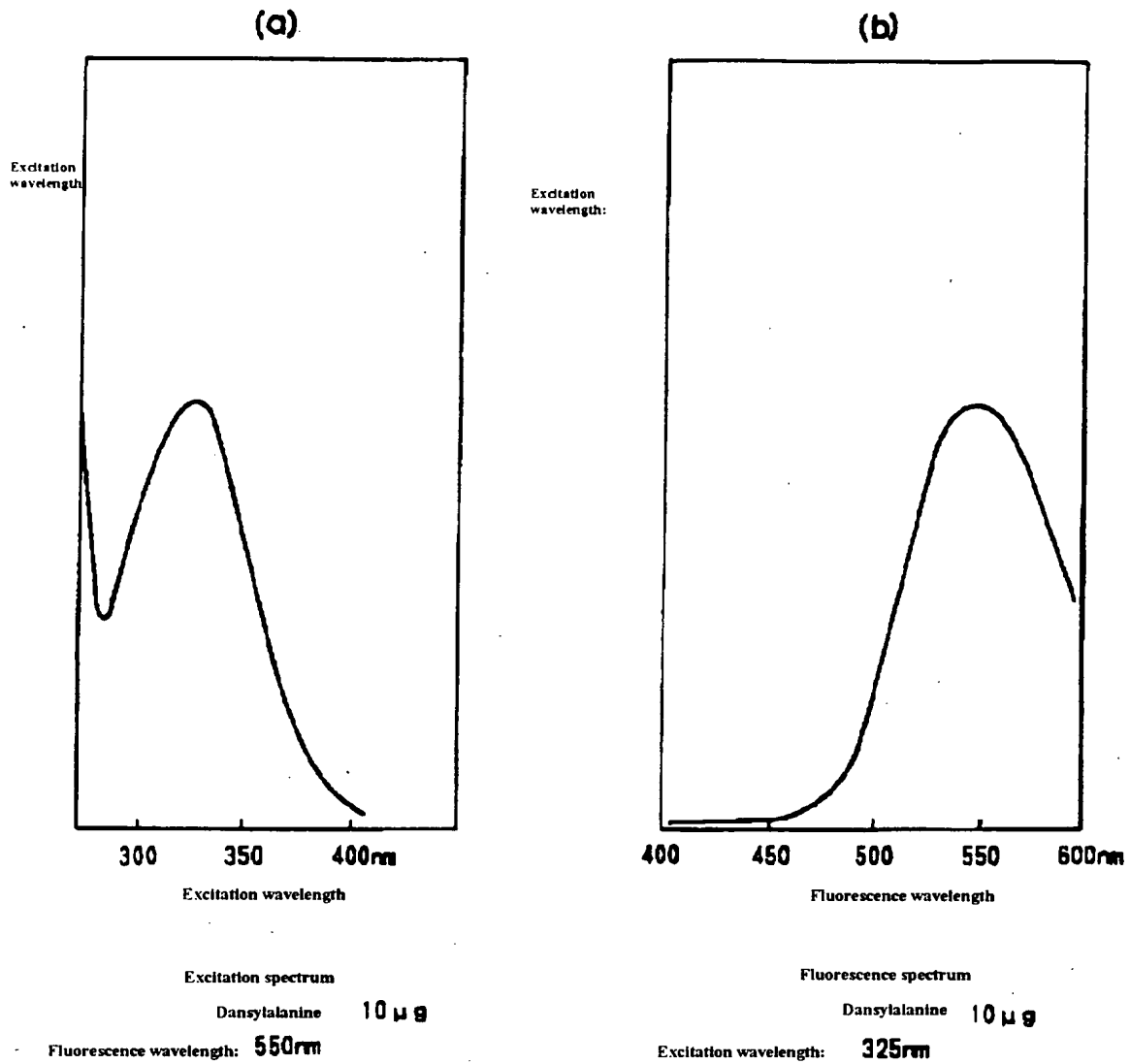




Figure 7

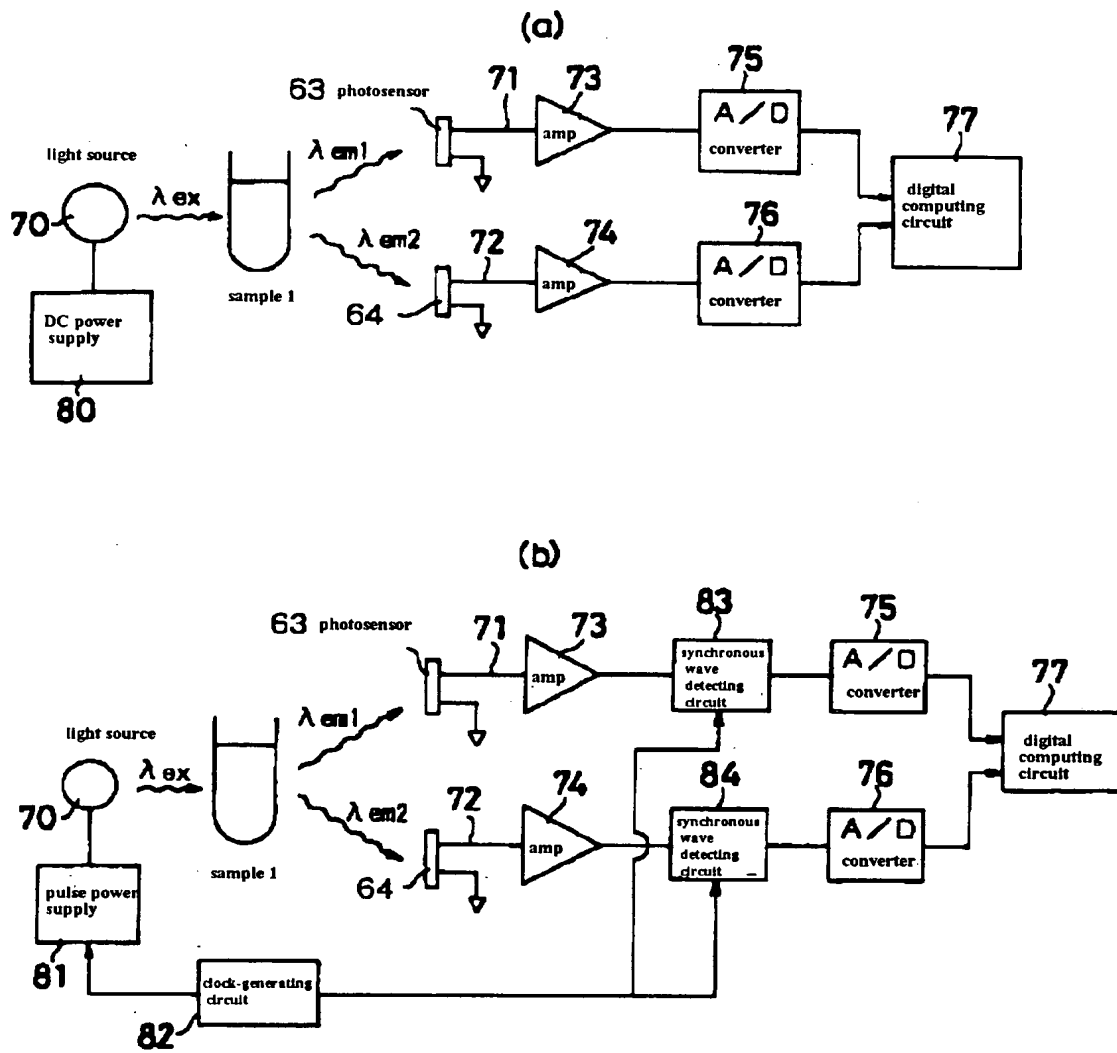


Figure 8

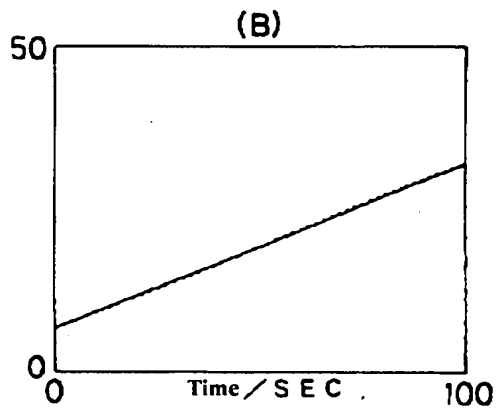
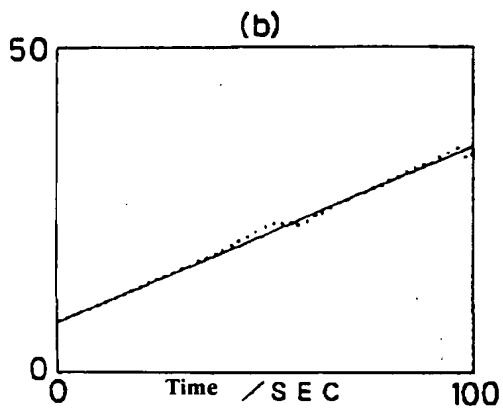
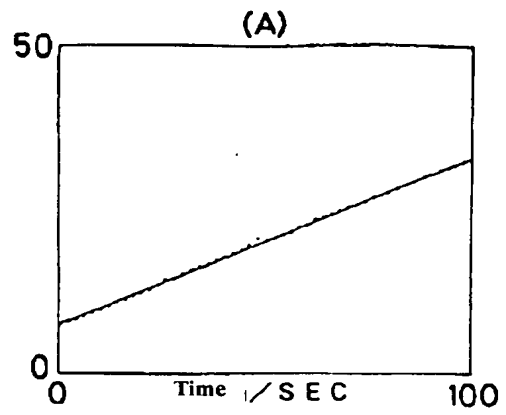
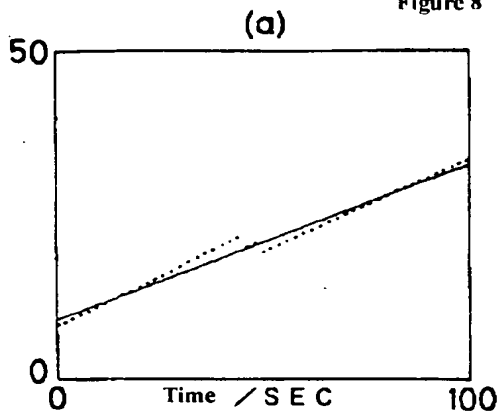
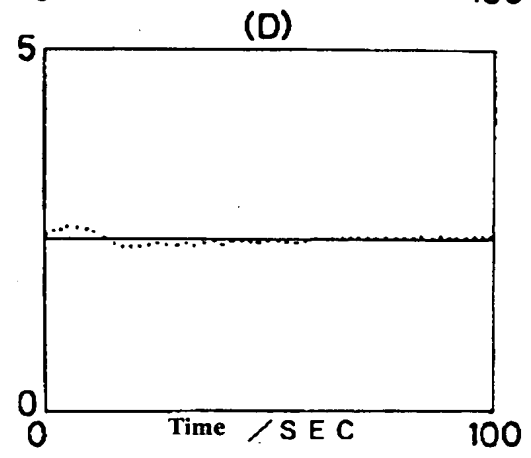
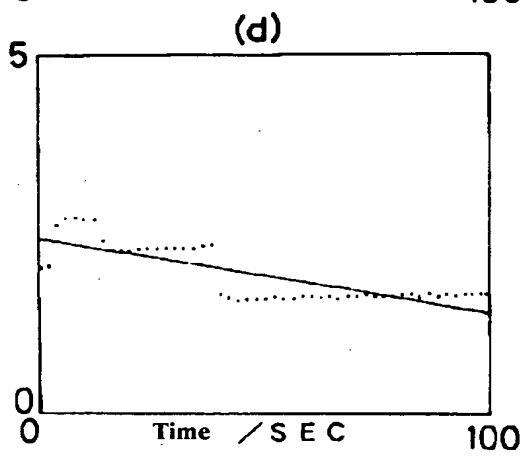
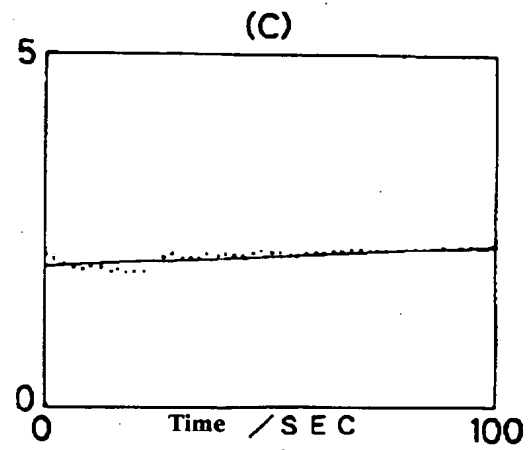
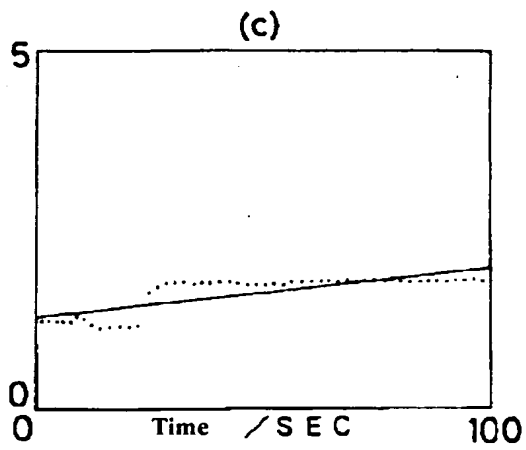


Figure 9



(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-38297

(43)公開日 平成5年(1993)2月19日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/00	Z	6807-4B		
C 1 2 M 1/34	E	7229-4B		
1/40	B	2104-4B		
C 1 2 Q 1/42		6807-4B		
G 0 1 N 21/64	Z	9115-2J		

審査請求 未請求 請求項の数9(全18頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-146301

(22)出願日 平成3年(1991)6月18日

(71)出願人 000003300

東ソー株式会社

山口県新南陽市開成町4560番地

(72)発明者 林 秀知佳

神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台1-19

(72)発明者 梅香家 佳彦

神奈川県横浜市戸塚区戸塚町4501

(72)発明者 光久 幸男

神奈川県海老名市河原口2398

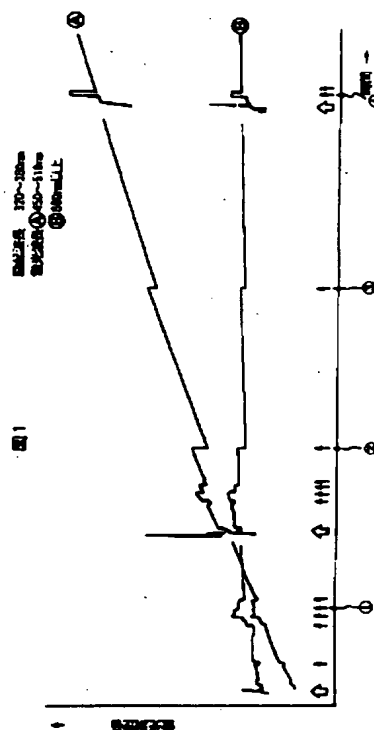
(74)代理人 弁理士 本多 小平 (外4名)

(54)【発明の名称】 酵素活性測定方法及び装置

(57)【要約】

【目的】 微量な試料中の生体物質等に結合した酵素の活性を、気泡やメニスカスの影響を受けずに精度よく検出できるようにする。

【構成】 試料の基準物質を混在させ、酵素の作用で変化する物質の蛍光強度を測定すると共に、酵素の作用を受けない基準物質の蛍光強度を測定して、これらの二つの蛍光強度から、試料中の生体物質の量を定量する。



**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** 酵素と、この酵素の作用を受けて生成物を生ずる基質と、上記酵素の作用は受けないが蛍光は発する基準物質とを含んだ試料に、励起光を照射し、これによって該試料から放射される蛍光のうち、少なくとも上記生成物からの蛍光を含む波長の蛍光強度により第一の測定値を求めると共に、該第一の測定値を求めた波長とは異なりかつ少なくとも上記基準物質からの蛍光を含む波長の蛍光強度により第二の測定値を求め、これら第一の測定値と第二の測定値の比に基づき上記酵素の活性を求めることを特徴とする酵素活性測定方法。

**【請求項2】** 請求項1において、基質及び生成物の双方が蛍光物質であることを特徴とする酵素活性測定方法。

**【請求項3】** 請求項1又は2において、励起光を、基質と生成物のうち少なくとも一方と基準物質の双方を励起できる波長領域を含むように設定すると共に、第一の測定値は、基質あるいは生成物のいずれか一方又は双方から放射される蛍光の波長領域で測定し、第二の測定値は、基質及び生成物から放射される蛍光が実質的に含まれずに基準物質から放射される蛍光が殆どである波長領域で測定することを特徴とする酵素活性測定方法。

**【請求項4】** 請求項1乃至3のいずれかにおいて、第一の測定値を第二の測定値で除算した値の経時的な変化率に基づいて酵素活性を求めることを特徴とする酵素活性測定方法。

**【請求項5】** 請求項1乃至4のいずれかにおいて、酵素が酵素標識免疫測定方法において測定される対象であることを特徴とする酵素活性測定方法。

**【請求項6】** 請求項1乃至4のいずれかにおいて、酵素が酵素標識DNAハイブリダイゼーション法において測定される対象であることを特徴とする酵素活性測定方法。

**【請求項7】** 酵素の作用に由来して増加あるいは減少する蛍光物質及び酵素の作用を受けないが蛍光は発する基準物質を含む試料に対して励起光を照射する投光手段と、試料が放射する蛍光のなかから上記蛍光物質に由来した第一の測定値を求める波長の成分を取り出して蛍光強度を測定する第一の受光測定手段と、試料が放射する蛍光のなかから上記基準物質に由来した第二の測定値を求める波長の成分を取り出して蛍光強度を測定する第二の受光測定手段と、これら第一の受光測定手段及び第二の受光測定手段で測定した測定値を入力として酵素活性を演算する演算手段とを備えたことを特徴とする酵素活性測定装置。

**【請求項8】** 請求項7において、試料が充填されている上方開口型の容器に対して投光手段から励起光を照射する光路と、この容器内の試料から放射されて受光手段に入射される蛍光の光路とを、該容器の上方開口から入射するように重複して設けたことを特徴とする酵素活

性測定装置。

**【請求項9】** 請求項7又は8において、演算手段が、第一の測定値を第二の測定値で除算する割算回路を有することを特徴とする酵素活性測定装置。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

**【産業上の利用分野】** 本発明は、免疫反応等の測定用標識として用いられた酵素の活性を、その酵素の作用を受けた物質の蛍光強度を検出することを通じて測定する方法、及び装置に関するものである。

**【0002】**

**【発明の背景と従来技術】** 従来より、例えば微量の生体物質を測定する方法として、酵素を標識として用いた酵素標識免疫測定方法や、酵素標識DNAハイブリダイゼーション法が知られている。

**【0003】** これらの方法は、免疫反応等により生じた免疫複合体等に直接的あるいは間接的に標識された酵素の活性を、基質の変化を検出することで、生体物質の存在や量の測定を行なうことを原理とした方法であり、例えば、酵素活性の作用を受けた試料の光吸収係数の変化を測定する方法、酵素活性の作用を受けた試料の蛍光強度の変化を測定する方法、酵素活性の作用を受けた試料の発光強度の変化を測定する方法等が知られている。そしてこれらのうち後二者の蛍光や発光を利用して酵素活性を測定する方法は、前者の光吸収による酵素活性を測定する方法に比べて高感度な測定が可能であり、しかも短時間で測定が可能という利点がある。なかでも蛍光を利用する方法は高感度な酵素活性測定法として知られている。

**【0004】** また、試料の蛍光強度等の変化から生体物質等を定量測定する場合の検出手法についてもいくつかの提案があり、例えば酵素反応が開始した後ある時間が経過した特定の時点で測定を行ない、その測定値から酵素活性を求める方法（一点法と称されている）、酵素反応が進む一連の過程中的前後の二つの時点で測定を行ないその測定値の差から酵素活性を求める方法（二点法と称されている）、酵素反応の進行に追従して略連続的に測定を行ないその連続した測定値の変化率から酵素活性を求める方法（レート法と称されている）などが知られている。

**【0005】** そして、近年においては特に臨床診断等の分野で微量物質の定量測定の意義、評価が次第に高まり、微量な生体物質を高精度、高感度に測定することが求められるようになってきており、このような要求に応じて、複数の試料間での汚染がないシステムや、検出感度が高くかつ多数検体の連続測定を行なうに適した検出器等も提案されつつある。

**【0006】**

**【発明が解決しようとする課題】** ところで、上述のような高感度、高精度な生体物質等の定量測定を目的として

提案され、あるいは既に実施に供されている従来の方法、装置においては、例えば、試料中に存在する気泡や液のメニスカス等の影響を無視できないために、測定精度を一定以上に向上させるのには限界があることが指摘されている。このようなものの影響によって限界を生ずる理由の一つは、代表的には、対象とする生体物質等の試料が一般に微量である点にある。微量である分上記影響を無視できない場合が多いからである。

【0007】例えば、気泡が存在すると気泡がない場合に比べて蛍光測定値が大きくなるため、測定中に気泡が消えると、例えばレート法では真の値よりも低いレート値を示す結果となる。ところが、標識酵素の反応を受ける基質を反応容器内に注入する場合、この基質分注は多数検体の迅速処理のために出来るだけ速やかに行なうことが望まれ、また分注量の精度を高める目的で分注終了時のノズル先端での液滴付着を避けることが求められるが、このためにノズルからの液吐出速度を大きくすると、分注液の泡立ちを招く傾向が大きくなる。また一般に酵素標識免疫測定においては、基質分注前に免疫反応複合体と未反応物を分離するいわゆるB/F分離の操作を行なうが、この際に使用する洗浄液に界面活性剤を含んでおり、その濃度を上げると気泡が発生し易くなる。

【0008】そこでこれらの問題を原理的に克服して、より精度を向上した測定を可能とする新たな提案が待たれている。

【0009】また上記の問題とは別に、蛍光測定の高感度化が求められている。例えばTSH（甲状腺刺激ホルモン）の免疫測定では、従来は検出下限界は0.1  $\mu$  IU/ml程度であったが、最近、TSHが異常低値を示す病態を診断する必要から0.01  $\mu$  IU/mlの検出下限界が求められるようになり、このために標識酵素の非特異的反応の低減化と共に、検出の高感度化が求められているのである。そしてこのような検出感度の向上のためには、外乱等による測定値の変化と、実際の測定値の変化とが明らかに区別できなければならない。

【0010】本発明者はこのような観点から鋭意検討を重ね、酵素標識免疫測定法や酵素標識DNAハイブリダイゼーション法による測定において、測定精度向上に障害となっている問題、例えば試料中の気泡の存在による影響、メニスカスによる影響、試料の攪拌のために例えば反応容器内に磁性粒子を添加してこれを振動磁界により移動させるようなことに伴う影響、光源光の経時的な変化、等々の影響を低減でき、誤差が少なく、高精度、高感度な測定を実現できる方法、装置の提供を目的として本発明をなすに至った。

【0011】また本発明の他の目的は、光源と反応容器の位置関係が容器に投射される光量が多少変化してもそれが測定結果に影響せず、常に安定して高精度な測定を実現できる方法、装置の提供をすることにある。

【0012】更にまた本発明の別の目的は、酵素標識免

疫測定法や酵素標識DNAハイブリダイゼーション法による測定を実施する場合に、従来、測定誤差低減のために装置構成上の負担が大きくなっていた基質分注手段や試料攪拌手段等の構成を簡易化、自動化に有益で、しかも高精度な測定を維持できる新規な測定方法及び装置を提供することにある。

#### 【0013】

【課題を解決するための手段及び作用】以上のような目的を実現するために、本発明者は、酵素と、この酵素の作用を受けて生成物を生ずる基質と、上記酵素の作用は受けないが蛍光を発する基準物質とを含んだ試料に、励起光を照射し、これによって該試料から放射される蛍光のうち、少なくとも上記生成物からの蛍光を含む波長の蛍光強度により第一の測定値を求めると共に、該第一の測定値を求めた波長とは異なりかつ少なくとも上記基準物質からの蛍光を含む波長の蛍光強度により第二の測定値を求め、これらの第一の測定値と第二の測定値の比に基づき上記酵素の活性を求めることを特徴とする本発明の酵素活性測定方法を完成した。

【0014】酵素活性を求めるには、例えば第一の波長領域で測定した第一の測定値を、上記第二の測定値で割った値の時間に対する変化率に基づき、例えば既知の試料を用いて予め作成しておいた検量線を用いて求めることができる。ここで蛍光強度の時間に対する変化率を、上述した二点法で求めたり、レート法として上述したように酵素反応の経過に追従して略連続的に測定を行ないその連続した測定値の変化率から酵素活性を求める方法が特に好ましい方法として推奨されるが、特にこれに限定されるものではない。

【0015】本発明方法の特徴は、次のように説明される。いま上記基質、酵素作用を受けて生ずる生成物、及び基準物質のいずれもが蛍光物質であるとし、これらに励起光を照射した時に各々の物質から放射される蛍光を考えると、蛍光強度は蛍光物質の濃度と比例関係を有し、また泡等の外乱の影響は全体に表われるから、上記の所定の波長で測定される第一の測定値(FI1)と、これとは異なる波長で測定される上記第二の測定値(FI2)とは夫々下記式で表わされることになる。

$$\text{【0016】} \quad (\text{FI1}) = p \times (k_1 \times [\text{基質}] + k_2 \times [\text{生成物}] + k_3 \times [\text{基準物質}])$$

$$(\text{FI2}) = p \times (k_4 \times [\text{基質}] + k_5 \times [\text{生成物}] + k_6 \times [\text{基準物質}])$$

(但し式中において、pは泡等により試料全体に現われる蛍光の変動係数であり、[ ]は夫々の物質の濃度、 $k_1 \sim k_6$ は夫々の物質のその波長領域に係わる比例係数を表し、 $k_1/k_4 = k_2/k_5 = k_3/k_6 \neq 0$ である。)

ここで、本発明方法によりこれらの比を求めると下記式(1)となり、更に基質濃度を生成物濃度で表わすように式を変形すれば、生成物濃度は下記式(2)により基

準物質濃度と比例係数  $k_1 \sim k_6$  から得ることができる。

【0017】

【数1】

$$\frac{FI1}{FI2} = \frac{k_1 \times [\text{基質}] + k_2 \times [\text{生成物}] + k_3 \times [\text{基準物質}]}{k_4 \times [\text{基質}] + k_5 \times [\text{生成物}] + k_6 \times [\text{基準物質}]} \quad \dots (1)$$

$$\begin{aligned} & (k_1 \times ([\text{基質}]_0 - [\text{生成物}]) + k_2 \times [\text{生成物}] + k_3 \times [\text{基準物質}]) \times FI2 \\ & = (k_4 \times ([\text{基質}]_0 - [\text{生成物}]) + k_5 \times [\text{生成物}] + k_6 \times [\text{基準物質}]) \times FI1 \\ & \dots (2) \end{aligned}$$

(但し、 $[\text{基質}]_0$  は反応容器に添加する基質の初期濃度として既知である。)

【0018】この式(1)あるいは(2)を用いて二つの測定値の比を求めることにより、酵素活性を示す値から蛍光の変動の影響が除去されることが分かる。

【0019】なお上記の式は、試料中に存在する基質、生成物、基準物質の全てが励起光によって蛍光を発する場合として一般的に説明しているが、第一の測定値を得るための波長の選択や、第二の測定値を得るための波長の選択等により、 $k_1=0$  や、 $k_1=k_4=k_5=0$  とすることもでき(なお完全に0である場合の他、実質的に0と見なすことができる場合であってもよい)、一方の測定値(例えば第一の測定値)において生成物からの蛍光強度を検出することと、他方の測定値(例えば第二の測定値)から基準物質の蛍光強度を検出することとを必須とすることで、本発明方法の目的を達成できる。

【0020】本発明の方法における励起光の波長は、基質と生成物のうちの少なくともいずれか一方、及び基準物質の双方を同時に励起することができる波長領域を含むように選択される。

【0021】試料中から放射される蛍光のうちで第一の測定値を求めるために測定する蛍光波長(以下「第一の蛍光波長」という)は、上述の如く、基質あるいは生成物から放射される蛍光の波長領域を含む範囲から選択され、第二の測定値を求めるための蛍光波長(以下「第二の蛍光波長」という)は、基準物質から放射される蛍光波長領域を含む範囲から選択される。ここで波長とは、所定の波長領域を包含するものをいう。

【0022】励起光の波長と第一の蛍光波長は、基質が生成物に変化することで生ずる蛍光特性の変化が蛍光測定値に反映するように選択される。

【0023】酵素は、遊離の天然酵素等であってもよいし、あるいは遊離の抗原、抗体、DNAなどに結合された酵素でもよく、更に、酵素標識免疫測定法や酵素標識DNAハイブリダイゼーション法の結果、小容器の内壁あるいはシート表面等に間接的に結合された酵素であってもよい。

【0024】酵素標識免疫測定法や酵素標識DNAハイ

ブリダイゼーション法における標識酵素としてはアルカリ性フォスファターゼや $\beta$ -ガラクトシダーゼ等を代表的に例示することができ、前者のアルカリ性フォスファターゼの作用で蛍光測定値が変化する基質としては、例えば4-メチルウンベリフェリルリン酸を例示できる。この基質は上記酵素の作用により4-メチルウンベリフェロンに変化(生成)する。また後者の $\beta$ -ガラクトシダーゼの作用で蛍光測定値が変化する基質としては、例えば4-メチルウンベリフェリルガラクトシドを例示でき、この基質は上記酵素により4-メチルウンベリフェロンに変化(生成)する。そして例えば上記生成物(4-メチルウンベリフェロン)に対し、アルカリ性(pH10)の下で365nmの波長を持つ励起光を照射(図4(b)参照)すると、4-メチルウンベリフェロンは450nm付近に極大をもつ蛍光(図4(a)参照)を発するが、4-メチルウンベリフェリルリン酸及び4-メチルウンベリフェリルガラクトシドからの蛍光は殆ど無視できる。したがって365nmの励起光を照射することで試料から放射される蛍光のうちから、450nm前後の波長の蛍光を取り出して生成物からの蛍光強度を測定することができる。

【0025】上記のような基質、生成物を含む試料に対し、本発明方法の特徴的構成として加えられる基準物質は、上記の励起光の照射を受けて、酵素の作用により変化する蛍光スペクトルの変化の形とは異なる蛍光スペクトルの形をもつ蛍光を放射する物質の中から選択される。

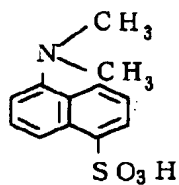
【0026】上記で代表的に例示した4-メチルウンベリフェロンの例でいえば、365nmの励起光の照射を受けて例えば500nm以上の波長の蛍光を放射する物質から該基準物質を選択することが好ましい。このような基準物質として用いることが出来る物質の例を以下の化1、化2に例示した。

【0027】

【化1】

## 1) ダンシル化合物

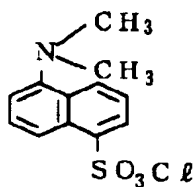
(例) ダンシルスルホン酸



325

550

ダンシルクロライド



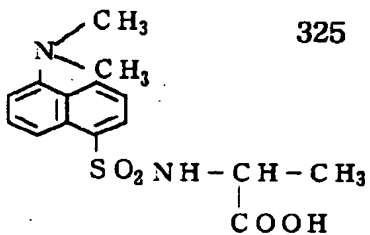
325

550

ダンシルアミノ酸

(例)

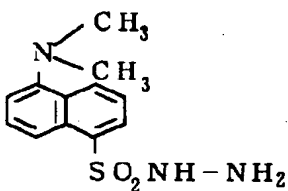
ダンシル-L-アラニン



325

550

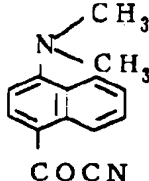
ダンシルヒドラジン



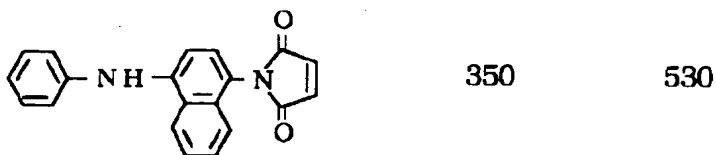
340

525



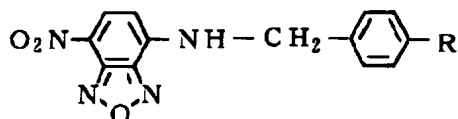
(構造式)	( $E_x^{\max}$ ) nm	( $E_m^{\max}$ ) nm
2) 4-ジメチルアミノ-1-ナフトイルニトリル		
	350	530

## 3) N-(1-アニリノナフチル)-4-マレイミド



350 530

4) 7-ベンジルアミノ-4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール(R=H)  
 7-(p-メトキシベンジルアミノ)-4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-  
 ジアゾール(R=OCH<sub>3</sub>)

340 530  
又は 458

【0029】これらの物質の励起スペクトルの極大は365nmにないが、例えば上記表中に例示されたダンシル-L-アラニン、図5(a)に示すように励起スペクトルに幅をもっているため、365nmの励起光を照射することで約550nmに極大をもつ蛍光の放射が得られる(図5(b)参照)。

【0030】なお酵素反応の生成物として4-メチルウンベリフェロンを用いダンシル-L-アラニンを基準物質として用いた場合には、両者の蛍光スペクトルが多少重なる(図4(b)及び図5(b)参照)。このため、第一の蛍光波長として450nm前後の波長の光を取り出すと、その中に基準物質からの蛍光もわずかに含まれることになるが、本発明の特徴である第一の蛍光波長で測定した第一の測定値と上記500nm以上の波長で測定した第二の測定値の比を求めても、その値は時間に対する変化率には影響しない。

【0031】また上述の場合、第二の蛍光波長で測定した第二の測定値に4-メチルウンベリフェロンからの蛍

光も含まれるが、4-メチルウンベリフェロンの影響が大きくなるように第二の蛍光波長と基準物質の濃度を選ぶことで本発明の効果を適切に発揮させることができる。具体的には例えば、上述の例の実施に当たり試料中に共存させるべき基準物質の濃度を、第二の蛍光波長における蛍光強度が十分に強く、しかも基準物質による励起光の吸収が過大にならない範囲とすること、一般的には吸収率が50%以下とすることがよい。また基質あるいは生成物の蛍光スペクトルの波長と基準物質の励起スペクトルの波長が重なる場合には、基質あるいは生成物から放射された蛍光が基準物質により再吸収されるので、基準物質の濃度は該再吸収の割合が過大とならない範囲、一般的には再吸収の割合が50%以下とすることがよい。

【0032】本発明方法の測定対象とできる試料は、上記酵素標識免疫測定法や酵素標識DNAハイブリダイゼーション法を適用できるものであれば特に限定されることなく、一般的には小さなカップ状の小容器に入れて

測定装置に供給される場合が多い。

【0033】また本発明の酵素活性測定装置の特徴は、酵素の作用に由来して増加あるいは減少する蛍光物質及び酵素の作用を受けないが蛍光を発する基準物質を含む試料に対して励起光を照射する投光手段と、試料が放射する蛍光のなかから上記蛍光物質に由来した第一の測定値を求める波長の成分を取り出して蛍光強度を測定する第一の受光測定手段と、試料が放射する蛍光のなかから上記基準物質に由来した第二の測定値を求める波長の成分を取り出して蛍光強度を測定する第二の受光測定手段と、これら第一の受光測定手段及び第二の受光測定手段で測定した測定値を入力として酵素活性を演算する演算手段とを備えたという構成をなすところにある。

【0034】上記において、励起光を照射する投光手段は、一般的には光源、レンズ、フィルター、ミラー、集光レンズ等を適宜組み合わせた光学系として構成される。光源は好ましくは点滅点灯する方式のものがよい。受光側での同期検波により、受光センサから得られる信号から外乱光等の影響を除去して、試料に起因する蛍光成分のみを取り出して、より信頼性の高い蛍光強度の検出が可能になるからである。光源点滅のためには、例えば機械式のチョッパでもよいが、放電管あるいは蛍光管を用いて数10Hz～数100Hzの範囲で点滅させる光源ランプは長時間連続運転での耐久性に優れた光源として有利である。電源には上記周波数の交流やパルス電源や、上記周波数で断続される数kHz～数十kHzの高周波交流電源を用いることもできる。

【0035】本発明における酵素活性測定装置の受光測定手段は、第一及び第二の受光測定手段として構成され、夫々、ミラー、集光レンズ、フィルター、フォトダイオードや光電子増倍管等の受光センサなどの受光光学系と、増幅器などの電気回路要素を組み合わせる構成される。なお上述したように光源光の点滅点灯手段が組み合わせられる場合には、例えば蛍光管等を点滅させるためのクロック信号を用いて受光センサからの電気信号を同期検波する検波器も併せて用いられる。

【0036】本発明における酵素活性測定装置は、試料に対して励起光を照射する向きと逆向きに試料から放射された蛍光を検出する方式や、励起光の照射と蛍光の取り出しを直角方向にする方式のいずれであっても良いが、多数の試料を対象として連続的な能率の良い酵素活性測定を行なうためには、投光系の光路と受光系の光路を重複させたトップトップ方式による構成のものが好ましく採用される。例えば投光系の光路中にダイクロイックミラー等を配置して光源光を反射させて下向きに照射し、かつ受光系の光路中に配置したフィルター、ハーフミラーあるいはダイクロイックミラー等により、試料から上向きに放射された蛍光を第一の蛍光波長の成分を含む光と、第二の蛍光波長の成分を含む光に分け、それぞれ別々の受光センサで検出するようにした構成のもの

を例示できる。特にダイクロイックミラーを用いることは、特性を励起光の波長と蛍光波長に合わせて選択することによって励起光と蛍光のロスを減らし有効に利用できる点で有利である。

【0037】光源光、受光センサ、フィルターなどの位置等は、例えばダイクロイックミラー等の採用する構成要素の特性に合わせて選択される。

【0038】図6の(a)～(c)は夫々、上述したトップトップ方式を採用した例の測定装置の光学系の構成概要を示したものであり、光源光501からの光をハーフミラー又はダイクロイックミラー507、508を介して試料容器2内の試料1に照射し、これによって放射された蛍光をフィルター505、506を通して受光センサ503、504に受光させるようにしている。なお図6(b)、(c)中の符号は、図6(a)と同じ構成要素にそれぞれ10、20を加えて付している。

【0039】本発明の演算装置において行なう割算処理は、第一の受光系で得られた電気信号と第二の受光系で得られた電気信号とを、アナログ的に処理してもよいし、上記各信号をA/D変換してデジタル信号に変換した後に、デジタルコンピュータなどのデジタル演算回路で処理するようにしてもよい。

【0040】図7は以上のような構成をもつ測定装置の信号処理系を模式的に示したものであり、図7(a)は直流電源80により連続点灯される光源70を用いた例であり、図7(b)はパルス電源81により点滅点灯される光源70を用いた例を示している。受光センサ63、64に入力された光は、電気信号71、72としてアンプ73、74で増幅され、A/D変換器75、76でデジタル信号に変換された後、コンピュータなどのデジタル演算回路77により、例えば時間に対する変化率の計算と割り算処理が行なわれる。

【0041】図7(b)の82はクロック発生回路であり、パルス電源81と受光系の同期検波回路83、84を同期させるように用いられる。

【0042】なお上記電気信号71、72をアナログ割り算回路に入力し、その出力をA/D変換器によってデジタル信号に変換し、その後、コンピュータなどのデジタル演算回路により、上述した時間に対する変化率の計算等を行なってもよいことは当然である。

【0043】

【実施例】以下本発明を図面に示す実施例に基づいて更に詳細に説明する。

【0044】実施例1

図3は、本発明方法の測定に用いる装置(トップトップ方式光学系を有する構成)の一例を示したものであり、この図において、2は数 $\mu$ l程度の少量の試料液1が充填されているカップ状の試料容器(上端口径10mm、容積1ml)であり、図示しない基質充填-酵素反応の工程を経て蛍光検出のための測定位置に移入され

る。この図3は測定位置に該試料容器1が移入された状態を図示している。なお本例における基質から変化した生成物は、4-メチルウンベリフェリルリン酸のアルカリ性フォスファターゼによる生成物であって、図4

(a)、(b)の蛍光特性を有する4-メチルウンベリフェロンであり、また基準物質としては図5(a)、

(b)で示した蛍光特性を有するダンシル-L-アラニンを用いた。

【0045】61は励起光の投光光学系の光源を示し、光源光は、320nm～380nmの光を透過するフィルター62を通して、ハーフミラー67により反射されて、試料容器2中の試料1に向けて励起光として下向きに照射されるようになっている。

【0046】この励起光の照射により試料液1から放射された蛍光は、上向きにハーフミラー67を通過し、ダイクロイックミラー68で第一の蛍光波長を含む光と第二の蛍光波長を含む光に分けられる。このダイクロイックミラー68は、530nm以上の光は透過するが、420nm～530nmの光は反射する特性をもつように設けられている。

【0047】上記ダイクロイックミラー68で分けられた第一の蛍光波長の光は、450nm～510nmの光を透過するフィルター65を通ることで波長を選択されて受光センサ63に受光され、他方第二の蛍光波長の光は、そのまま上向きに進み600nm以上の光を透過するフィルター66を通ることで波長を選択されて受光センサ64に受光される。

【0048】以上の構成をなす測定装置を用いて、アルカリ性フォスファターゼで標識された生体物質、基質(4-メチルウンベリフェリルリン酸)と基準物質(ダンシル-L-アラニン)を混在させた試料液の蛍光を測定した。なおアルカリ性フォスファターゼは任意量、4-メチルウンベリフェリルリン酸の濃度は1mM、ダンシル-L-アラニンの濃度は100μg/mlである。

【0049】これにより検出された第一の蛍光波長の測定値Aと第二の蛍光波長Bの測定値の時間依存性を図1に示した。また、第一の蛍光波長で測定した第一の測定

$$(\text{Sig}(4\text{MU}) - \text{Sig}(4\text{MU}_0)) / (\text{ref}(\text{DLA}) - \text{ref}(\text{DLA}_0)) \quad \dots (3)$$

(但し、式中においてSig(4MU)は、第一の波長によって測定された蛍光強度の測定値(実質的に4-メチルウンベリフェロンの蛍光強度)であり、Sig(4MU<sub>0</sub>)は空カップでの測定値である。また、ref(DLA)は第二の波長によって測定された蛍光強度の測定値(実質的に基準物質の蛍光強度の測定値)であり、ref(DLA<sub>0</sub>)は空カップでの測定値である。)

また、アルカリ性フォスファターゼを添加しない他は上記と同様にして試験を行ない、同様にして蛍光強度の測定及びレート算出を行なって(試験例No11～19)、その結果を下記第2表に示した。また試験を行なったうち(No13, 15)については、検出操作を行

値を第二の蛍光波長で測定した第二の測定値で割った値(相対蛍光強度)の時間依存性を図2に示した。図1及び図2中の①～④で示した位置は、人為的に試料液に空気を吹き込むことで形成された泡が破壊又は移動したため、測定される蛍光の強度が変化した位置を示している。

【0050】ここで図の対比から分かるように、空気を吹き込むと蛍光強度が大きく変化するが、図2で示した第一の蛍光測定値を第二の蛍光測定値で割った値は、気泡の影響を受けることがなく、したがって本発明方法により測定した測定値は、試料中に気泡が存在してもその影響を受けることなく、蛍光物質の蛍光強度の変化を正確に検出できる効果が確認された。

#### 【0051】実施例2

本発明方法により得られた測定の結果を従来方法と比較するために次の試験を行なった。

【0052】上記実施例1と同様の構成を有する装置A1A 1200(株)東ソー社製)を用いて以下の試験を行なった。すなわち、本例では攪拌用の磁性体粒子(直径約1.5mm)の数個を填加した上記試料容器に、アルカリ性フォスファターゼ50μlをピペッターにより手分注し、これに、4-メチルウンベリフェリルリン酸溶液(4-メチルウンベリフェリルリン酸26mgを、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノールを4.5g含有する水溶液100mlに溶解して調整したもの)に予めダンシル-L-アラニンを0.1mg/ml(基質溶液100mlに対して5mg)添加した溶液をピペッターにより手分注で200μl分注し、これを直ちに検出器下に移動させて、直後から2秒間隔で100秒間、第一及び第二の波長で蛍光強度の測定を行ない、以下の算出式(3)を用いて最小二乗法によりレートを求めて(試験例No1～10)、その結果を下記第1表に示した。なお測定中は磁性体粒子を振動磁界により往復運動させた。また試験を行なったうち(No1, 9)については、検出操作を行う直前に容器内の液に空気を吹き込んだ。

#### 【0053】

う直前に容器内の液に空気を吹き込んだ。なお本実験では、市販の免疫反应用試薬(Eテスト「TOSOH」、東ソー株式会社製)から取得した攪拌用ビーズを使用した。ビーズは、使用に先立って十分に洗浄したが、ごく僅かなアルカリ性フォスファターゼがその表面に非特異的に結合してるものと考えられた。

【0054】更にまた、比較のために、上記アルカリ性フォスファターゼを添加した場合と添加しなかった場合の夫々につき、上記第一の波長で検出した蛍光強度の測定値のみから、従来の算出法に従った下記の式(4)を用いて最小二乗法によりレートを求め(No1～10及びNo11～19)、その結果を下記第1表、第2表に

併記した。

【0055】

$$((\text{Sig}(4\text{MU}) - \text{Sig}(4\text{MU}_0)) / \text{ref}(\text{UV})) \times 50 \quad \dots (4)$$

(但し、式中においてSig(4MU)、Sig(4MU<sub>0</sub>)は上記の式(3)と同様である。なお(／ref(UV))の項は、光源光の経時的な変動を除去するために測定値を光源光の強度で除算する項であり、(×50)の項は、本発明方法の

測定値との比較を容易化するために便宜的に掛けた係数である。)

【0056】

【表1】

第1表

No	Rold (／sec)	Rnew (／sec)
1	0.232	0.256
2	0.267	0.257
3	0.276	0.259
4	0.277	0.256
5	0.280	0.256
6	0.270	0.248
7	0.236	0.224
8	0.291	0.250
9	0.267	0.253
10	0.285	0.252
平均	0.268	0.251
CV	6.9 %	3.8 %

但し、表中において

Rold : 従来方法による測定値

Rnew : 本発明方法による測定値

CV : 変動係数

を示している。

【0057】

【表2】

第2表

No	Rold (/sec)	Rnew (/sec)
11	$0.120 \times 10^{-3}$	$0.157 \times 10^{-3}$
12	$0.098 \times 10^{-3}$	$0.082 \times 10^{-3}$
13	$0.733 \times 10^{-3}$	$0.315 \times 10^{-3}$
14	$0.099 \times 10^{-3}$	$0.129 \times 10^{-3}$
15	$-1.05 \times 10^{-3}$	$0.023 \times 10^{-3}$
16	$-0.112 \times 10^{-3}$	$0.119 \times 10^{-3}$
17	$0.131 \times 10^{-3}$	$0.134 \times 10^{-3}$
18	$0.175 \times 10^{-3}$	$0.026 \times 10^{-3}$
19	$-0.289 \times 10^{-3}$	$0.038 \times 10^{-3}$
平均	$-0.0105 \times 10^{-3}$	$0.144 \times 10^{-3}$
SD	$0.0449 \times 10^{-3}$	$0.0998 \times 10^{-3}$

但し、表中において

Rold : 従来方法による測定値

Rnew : 本発明方法による測定値

SD : 標準偏差

を示している。

【0058】この第1表の結果から、従来法に比べ本発明方法による場合において、変動係数(CV値)が小さく、高精度な測定結果の得られることが確認でき、また第2表の結果から、本発明方法では従来法に比べて標準偏差(SD値)が大幅に小さいことが確認された。

【0059】また、測定中に空気を検出操作を行う直前に場合の測定値の変動を明かとするために、上記アルカリ性フォスファターゼを添加した場合の本発明方法の算出結果を図8の(A)、(B)に、従来法の算出結果を同図8の(a)、(b)で示し、アルカリ性フォスファターゼを添加しなかった場合の本発明方法の算出結果を図8の(C)、(D)に、従来法の算出結果を同図8のc、dで示した。

【0060】これらの図から、従来法の算出結果(a~d)では空気を吹き込んだ時点で大きな乱れが生じているが、本発明方法の算出結果(A~D)ではこのような乱れの生じていないことが分かる。

【0061】

【発明の効果】以上述べたように、本発明よりなる酵素活性測定方法及びその装置は、酵素標識免疫測定法や酵素標識DNAハイブリダイゼーション法等において高精度の酵素活性の測定が要求される場合に、試料中の気泡やメニスカスの影響による誤差が極めて少なく高精度な

測定が行なえるという効果がある。

【0062】また酵素標識免疫測定法や酵素標識DNAハイブリダイゼーション法による測定を機械化した装置で実施する場合の測定誤差を小さくするため、従来装置構成上の負担が大きかった基質の分注手段、酵素反応中の攪拌手段等を、高精度な測定を維持しつつ簡易に構成できるという効果もある。

【0063】また従来のこの種の測定装置においては、例えば励起光を発するランプの発光強度が経時的に劣化するという問題を考慮して該ランプの発光強度を検出するセンサを利用し測定蛍光値を補正(例えば測定検出した蛍光値を発光強度で割算する補正)を行なっている例はあるが、この方式では、ランプ発光強度の経時的な変化を補正することはできても、測定対象の試料容器とランプの位置がずれているために該容器に入る光束が変動することには対処できないのに対し、本発明方法の方式では、上記式(1)からも分かるように、同一時点で測定した二つの蛍光強度の比が、測定結果となるため、光源光の強さは直接測定結果に影響せず、測定精度の飛躍的な向上が得られるという効果がある。

【0064】更に上記のように種々の外乱の影響が除去されるため、高感度な測定が実現できる効果もある。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例において測定された第一の蛍光波長での第一の測定値と第二の蛍光波長での第二の測定値の時間依存性を示した図である。

【図2】第一の測定値を第二の測定値で割った相対蛍光強度の時間依存性を示した図である。

【図3】本発明の実施例の蛍光検出器の構成概要の一例を示した図である。

【図4】4-メチルウンベリフェリルリン酸のアルカリ性フォスファターゼによる生成物である4-メチルウンベリフェロンの励起スペクトルと蛍光スペクトルを示した図である。

【図5】基準物質であるダンシルアラニンの励起スペクトルと蛍光スペクトルを示した図である。

【図6】(a)～(c)は夫々、本発明の酵素標識免疫測定装置を構成する測定光学系の構成概要を説明するための図である。

【図7】(a), (b)は夫々、本発明の測定法における信号処理を示した図である。

【図8】(a), (b)はアルカリ性フォスファターゼを添加した試料液の蛍光強度の変化を従来法により算出した結果を示した図であり、(A), (B)は同蛍光強度の変化を本発明方法により算出した結果を示した図である。

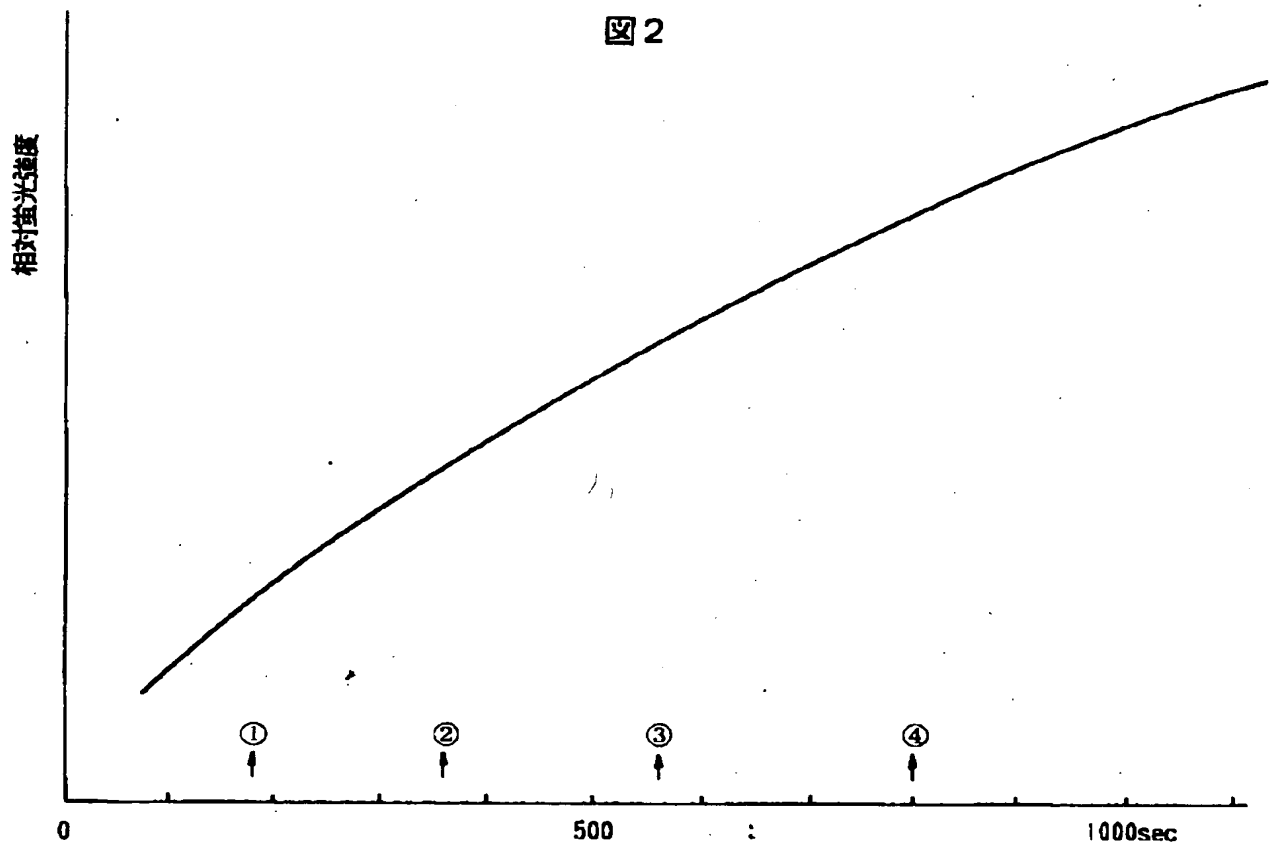
【図9】(c), (d)はアルカリ性フォスファターゼを実質的に添加しなかった試料液の蛍光強度の変化を従来法により算出した結果を示した図であり、(C), (D)は同蛍光強度の変化を本発明方法により算出した結果を示した図である。

【符号の説明】

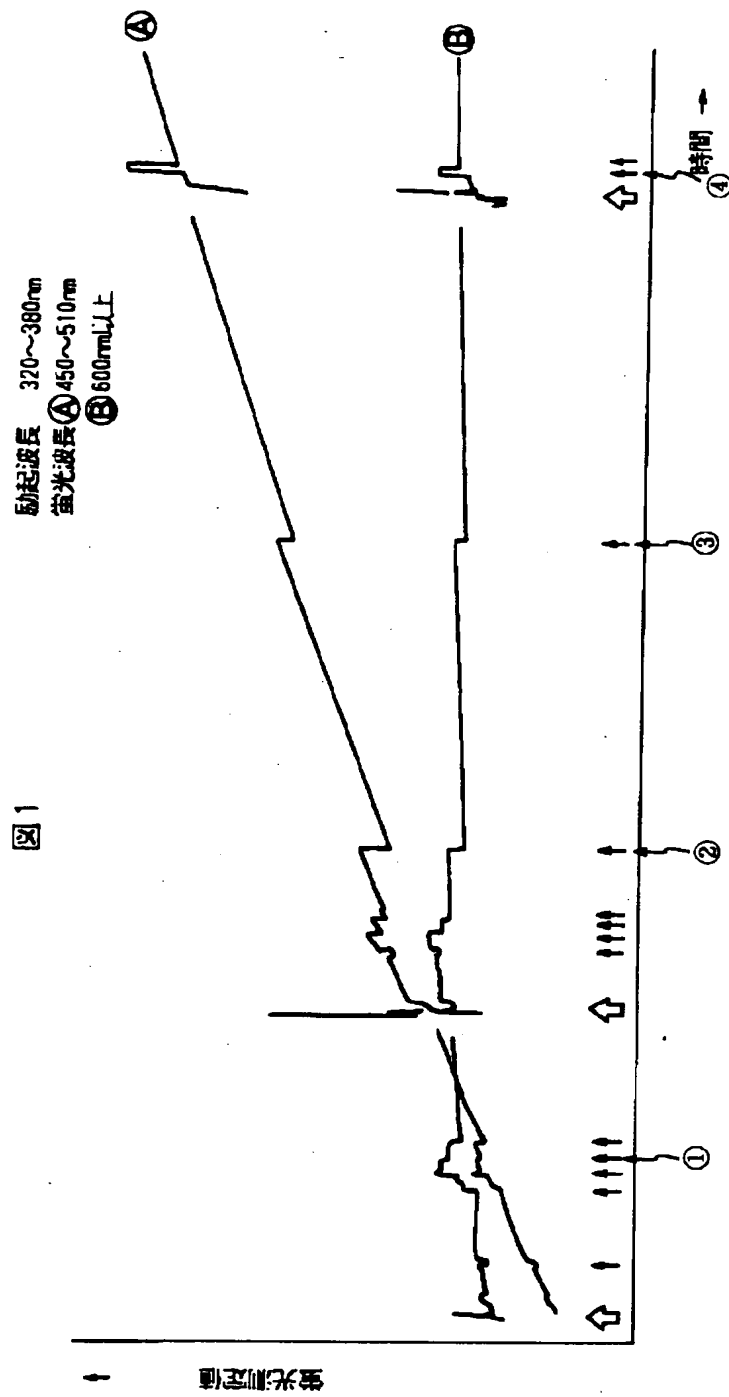
61・・・光源、62, 65, 66・・・フィルター、  
63, 64・・・受光素子、67・・・ハーフミラー、  
68・・・ダイクロイックミラー。

【図2】

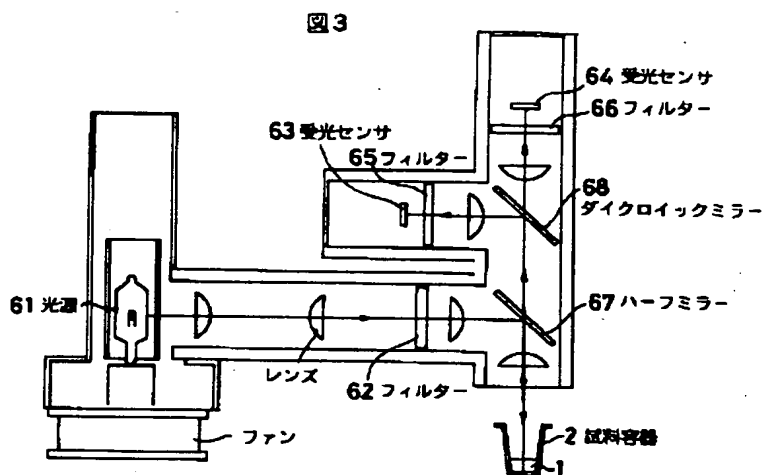
図2



【図1】

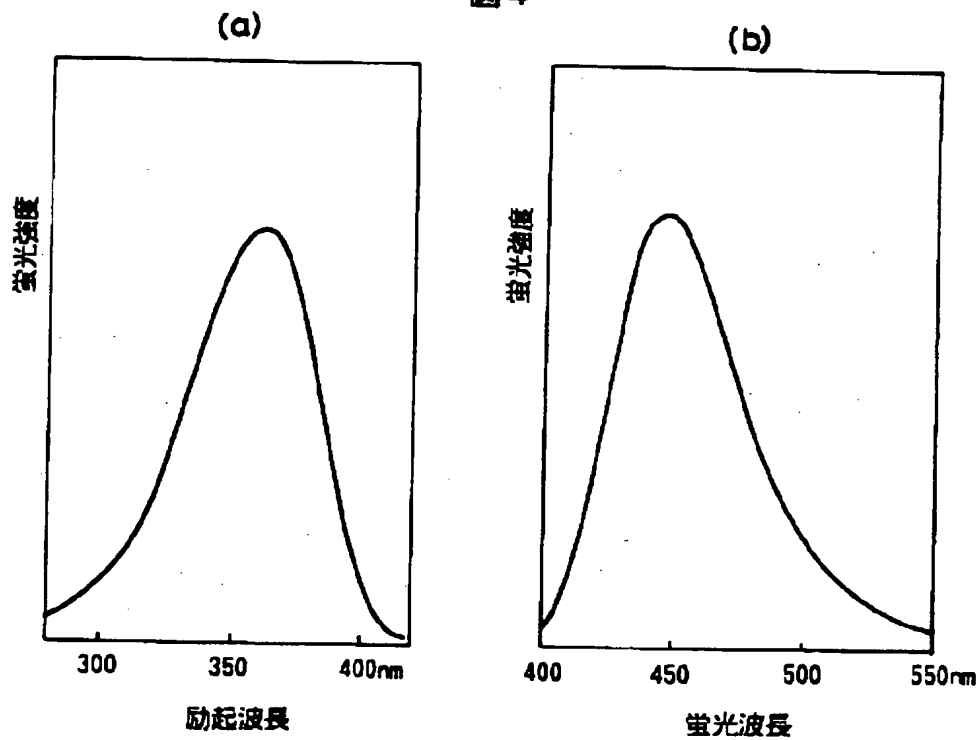


【図3】



【図4】

図4



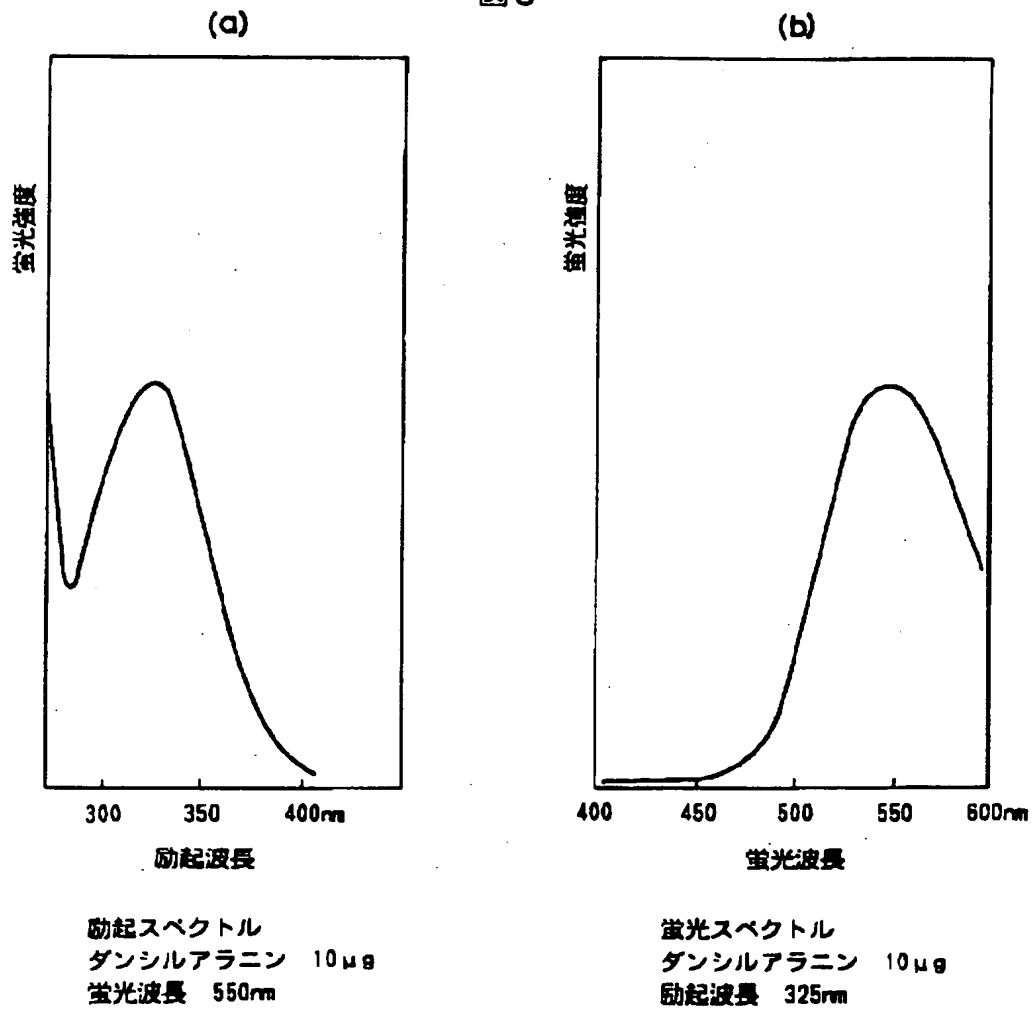
励起スペクトル  
4-メチルウンベリフェロン  
pH10  
蛍光波長 450nm

蛍光スペクトル  
4-メチルウンベリフェロン  
pH10  
励起波長 365nm

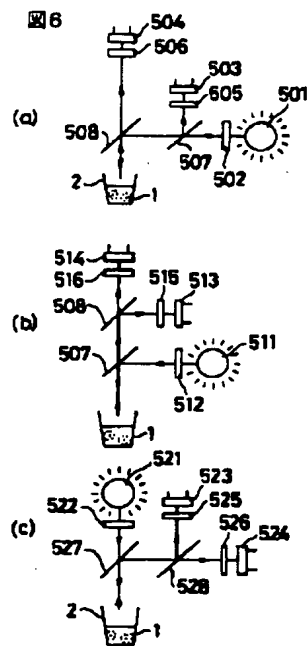


【図5】

図5



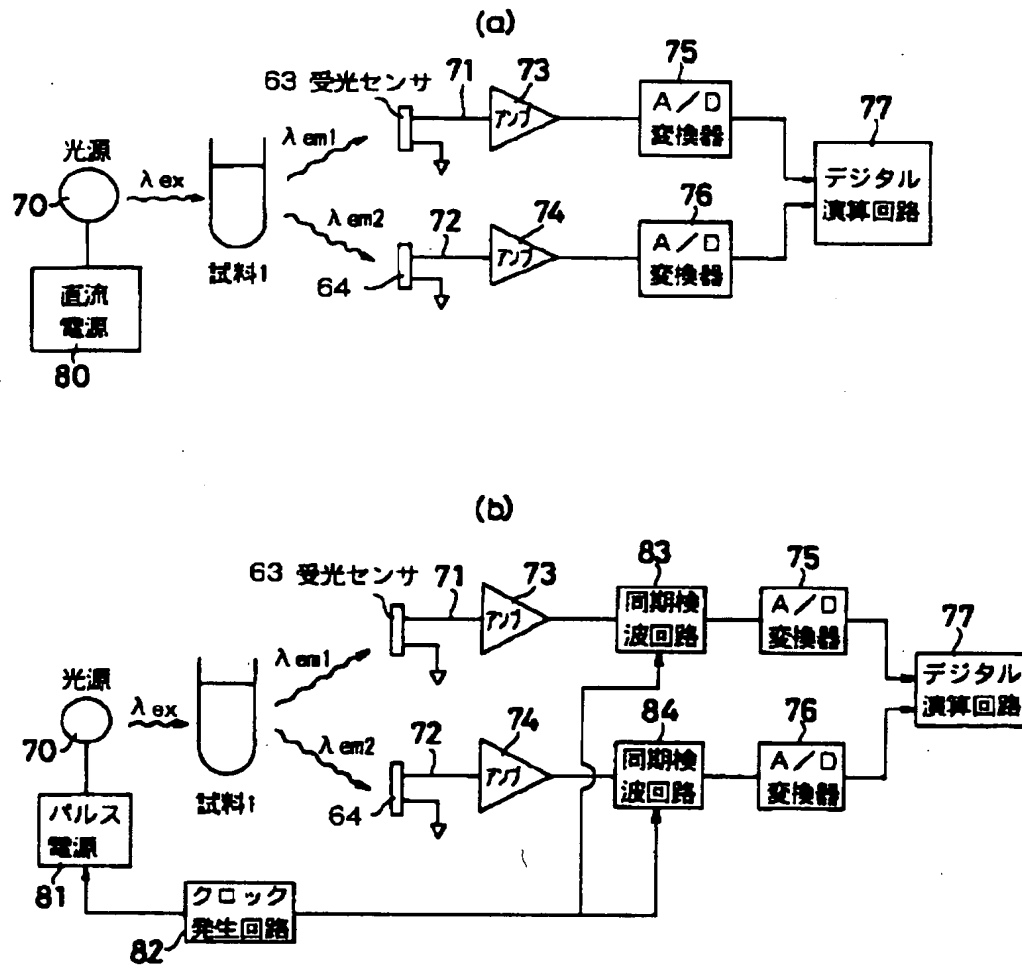
【図6】



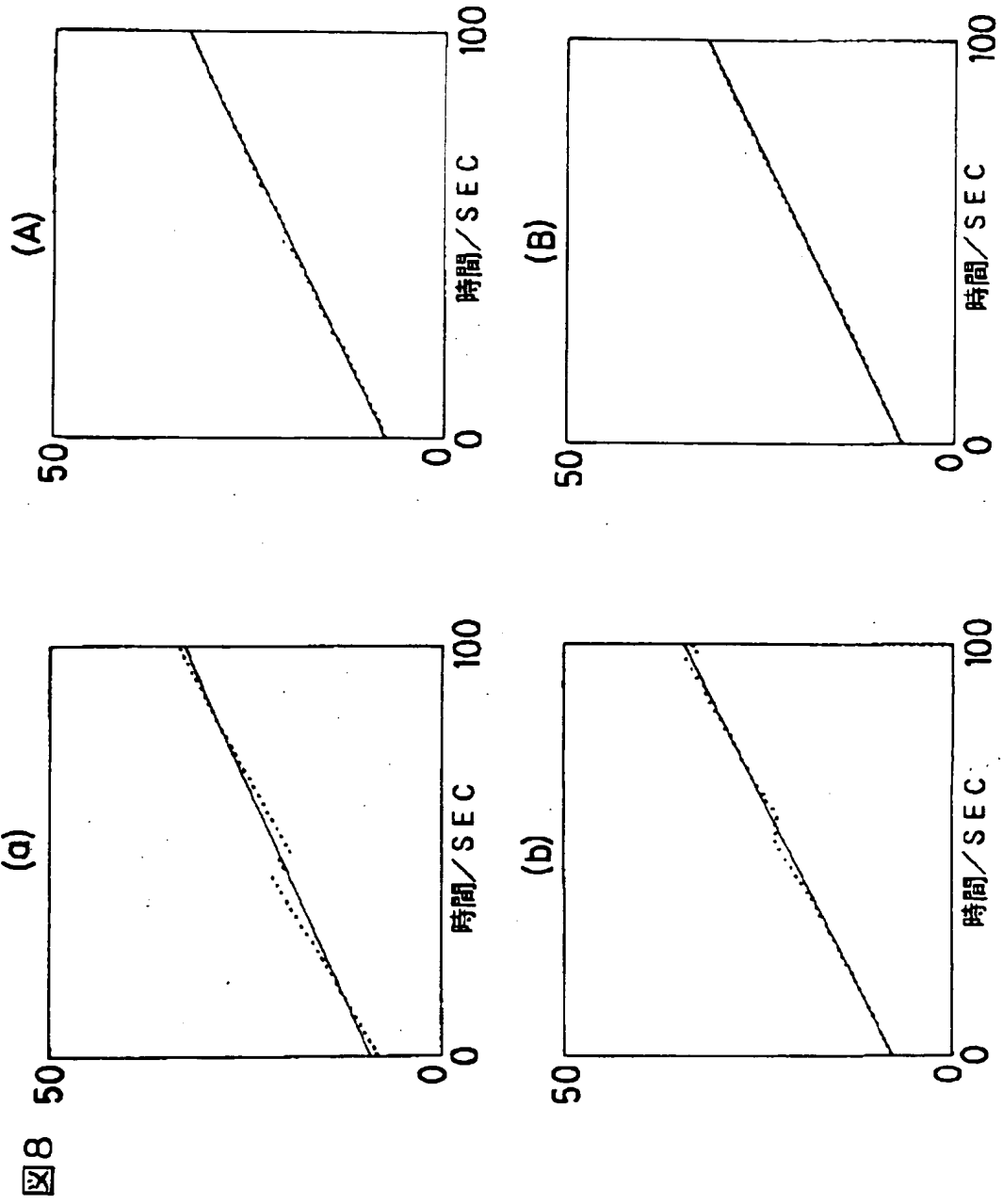
501, 511, 521...光源  
 502, 503, 505, 512, 515, 516, 522, 525, 528...フィルタ  
 503, 504, 513, 514, 523, 524...受光センサ  
 507, 508, 517, 518, 527, 528...ハーフミラーまたは  
 ダイクロイックミラー

【図7】

図7



【図8】



【図9】

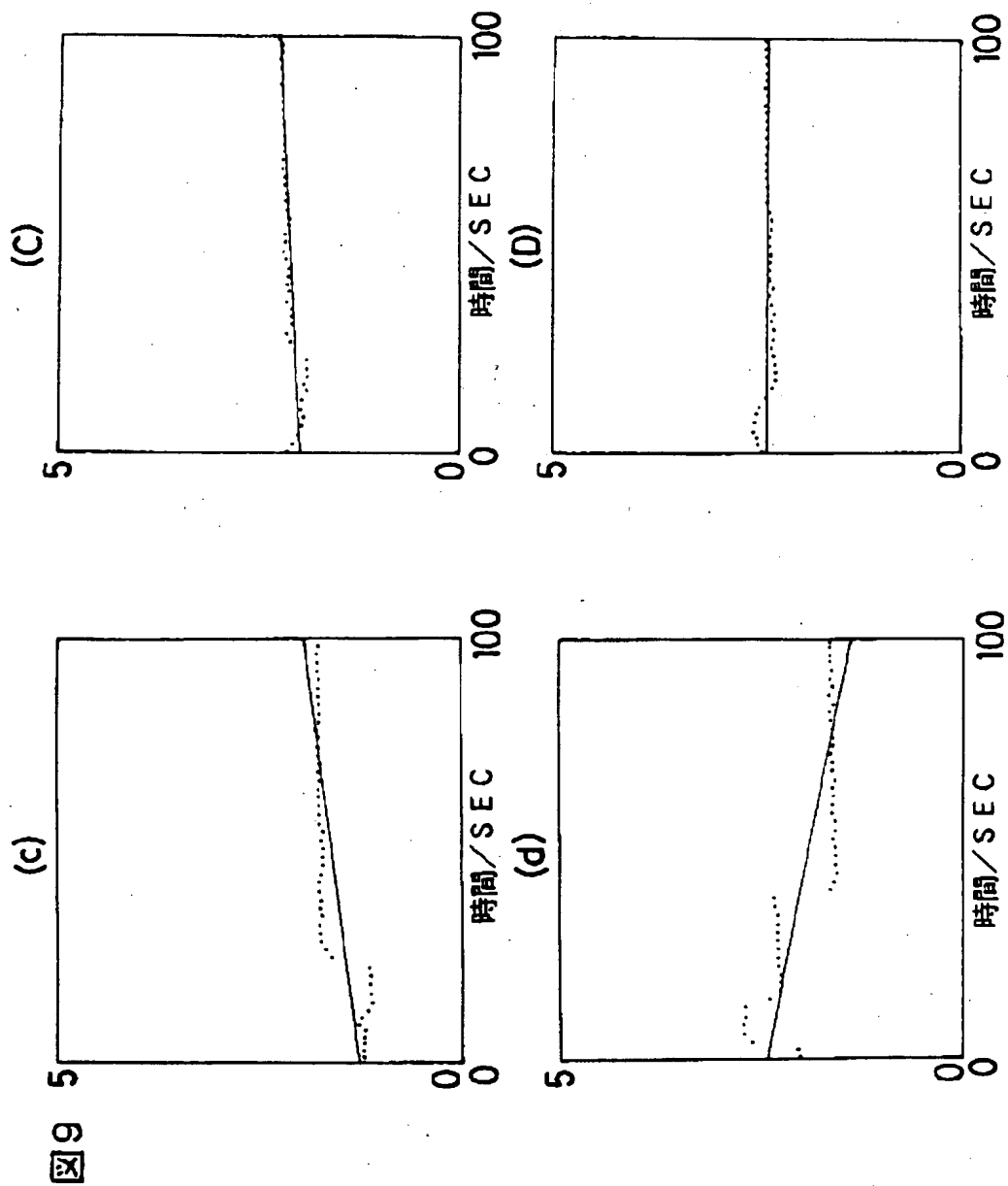


図9

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

G 0 1 N 33/535

33/543

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

8310-2 J

C 7906-2 J